

## 中文摘要

本研究以相轉換法製備生物分解性高分子—聚丁基烷酯Poly(3-hydroxybutyrate)薄膜，並將其表面改質，接枝聚丙烯酸及固定離胺酸，然後進行骨母細胞(hFOB 1.19)培養以探討其生物相容性。薄膜之孔隙結構與孔隙尺寸可藉由製膜參數(例如製膜液溶解溫度)加以控制，表面孔徑約在數微米範圍(參閱 92 年成果報告)；接枝聚丙烯酸乃以電漿聚合法進行，實驗結果顯示接枝條件如電漿處理時間、電漿功率大小、接枝反應時間、單體濃度及薄膜結構等皆可影響接枝量(參閱 92 年成果報告)，本研究最大接枝量可達  $0.48 \text{ mg/cm}^2$ ；固定離胺酸乃利用 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC)為媒介使離胺酸與丙烯酸反應形成醯胺鍵，而將離胺酸固定於薄膜上，固定量受反應條件如EDAC濃度、反應pH值、反應時間、離胺酸濃度、薄膜孔隙結構等影響，最大固定量為  $0.55 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 。各薄膜皆用於骨母細胞培養，結果顯示細胞在多孔型薄膜上之貼附與生長情形優於緻密型薄膜，聚丙烯酸會抑制細胞之成長，而離胺酸則可提升，然而後者之固定量太低，所以提升成效受到限制。

關鍵字：生物可分解高分子，聚丁基烷酯，多孔型薄膜，表面改質，離胺酸，細胞培養

## Abstract

In this research, membranes of a biodegradable polymer, poly(3-hydroxybutyrate), were synthesized by the phase inversion technique. The surfaces of the formed membranes were modified by first grafting with poly(acrylic acid) and then immobilizing with lysine. These membranes were employed in culture of osteoblast (hFOB 1.19) to examine their biocompatibility. The porous structure and pore size of the membrane were controlled by formation parameters, e.g., dissolution temperature of casting dope. The pore size of the surface fell on the range of several microns. Plasma-induced polymerization method was used to graft poly(acrylic acid) on the membrane surface. Various process variables, viz., plasma treatment time, plasma power, grafting reaction time, monomer concentration, and membrane porous structure were found to affect the graft yield, for which the largest attainable value was 0.48 mg/cm<sup>2</sup> under optimal conditions. Immobilization of lysine on the membranes was carried out by forming amide bonds with previously grafted poly(acrylic acid), using 1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDAC) as a medium. The immobilization yields were dependent on reaction conditions, such as concentration of EDAC, pH, reaction time, concentration of lysine, membrane structure, etc., with a highest yield of 0.55 µg/cm<sup>2</sup>. Culture of osteoblast cell on various membranes indicated a better attachment and growth of the cell on porous membranes than on dense ones. Poly(acrylic acid) inhibited the growth of osteoblast cell, while, by contrast, lysine promoted it. However, as a result of low immobilization yield, the latter improvement was more or less confined.

Keywords: biodegradable polymer, poly(3-hydroxybutyrate), porous membrane, surface modification, lysine, cell culture.

## 1. 前言

以微生物發酵製造的聚羥基丁酯類(Poly(3-hydroxybutyrate)；PHB)是目前重要的生物可分解性塑膠之一，它具有高熔點、高結晶性、易熱分解及良好的生物相容性等特點，然而與泛用塑膠或澱粉類生物分解型高分子比較其價格卻高出許多，因此在實用角度上必需以高附加價值之產品為應用導向，如此才能符合經濟與環保之效益。基於此觀點開發 PHB 在生醫材料方面之用途實為一重要研究課題，況且經改質後之生物分解性高分子若植入體內尚有自然分解、避免代謝副產物作用及二次手術之優點，相當值得開發利用。

於上年度計畫我們以浸漬沉澱法製備各種不同孔隙結構之 PHB 薄膜，本年度我們將薄膜加以改質接上親水性的聚丙烯酸及離胺酸並探討其在人造環境進行細胞培養之可行性，例如觀察在不同孔隙結構或化學組成之薄膜上，對骨母細胞之貼附及生長影響，同時希望利用其生物分解之特性成為有用的新型生醫材料。

## 2. 目的

本研究之主要目的是將上年度所開發出的各種 PHB 薄膜，進行電漿表面接枝與化學修飾改質使其適用於骨母細胞之培養，以作為骨骼重建之基礎，而 PHB 具生物分解性待組織修復後便可自行分解，而不需進行二次手術取出，使其實用性大為提昇。

## 3. 原理

### 3.1 生物可分解性高分子生醫材料

生物可分解性高分子材料【1~5】的特性在於使用期間可保有與傳統塑膠類似的性質，但在使用後可被自然界存在的微生物分解成為低分子量物質，最後變成二氧化碳及水等。在眾多的生醫材料中，生物可分解性高分子可算是較具特色的一種，一般的陶瓷、金屬、高分子等生醫材料，必須能提供長時間的結構穩定性及機械性質，而生物可分解

性高分子在生醫領域的應用主要是其可被人體自然分解，產生對人體無害或可被自然代謝的副產物(如水、乳酸等)，如此一方面可以避免患者為了取出手術植入物，再次接受手術的困擾與風險，二來也避免代謝產物沉積於人體內的副作用，而此問題常見於早期的金屬或高分子人工關節，由於長時間磨耗的結果產生許多沉澱物，導致關節附近的組織產生發炎或病變，因此，在一些只需短時間使用之非永久性材料上，生物可分解性高分子可以說是一個良好的選擇。

一般常見的生物可分解性高分子之應用有韌帶重建、手術縫線、人工皮膚、藥物釋放載體與生物黏膠等，隨著用途不同原料來源也有若干差異，有些是取材於自然界的萃取物或動物身體組織，有的則是利用化學合成或是酵素培養來取得，但這些來源之主要缺點就是品質不穩定或是價格過高，因此如何改進這些缺點，以得到經濟而穩定的生物可分解性高分子乃是相當值得研究開發的課題，這也是本計畫之第一~四子計畫所致力研究的方向。

### 3.2 浸漬沉澱法製備高分子薄膜

薄膜一般較為普遍的定義是一分離兩相且具有選擇性的高分子膜狀屏障物，此選擇性即可達成濃縮、純化及分離等目的。薄膜可利用高分子、金屬、陶瓷等材料來製作【6】，而高分子薄膜則因其結構豐富，故應用範圍也最廣，如氣體分離、海水淡化、食品濃縮、血液透析與藥物釋放等。多孔型薄膜依其結構一般又分為兩類：(一)對稱型薄膜(symmetric membrane)，此類薄膜上下表面及截面孔隙結構均勻，其主要用途是微過濾。(二)非對稱型薄膜(asymmetric membrane)，此類型薄膜之主要特徵則為其上表面有一緻密皮層，主要用途則為超過濾及逆滲透。

多孔型薄膜之製備方式有很多種，如：燒結法、拉伸法、熱相轉換法、溶劑揮發所引起的相轉換法等【6~12】；而工業上最常以浸漬沈澱法來造膜，此方法之配方通常必需包括非溶劑(nonsolvent)、溶劑及高分子三者；其中非溶劑與溶劑互溶，但卻無法溶解高分子，而溶劑可溶解高分子，一般為有機溶劑。浸漬沉澱法的主要步驟為：將非溶劑、

溶劑、高分子三者循一定比例配製成製膜液，並依實際需要在製膜液中加入添加劑(如各類非溶劑、無機鹽類、其它高分子等)，然後把溶液均勻地平鋪於載體上，接著浸漬到以非溶劑為主體之沈澱槽中；當製膜液與沈澱液接觸時，由於製膜液與沈澱液間化學勢能之差異，造成溶劑擴散離開薄膜，而非溶劑則進入薄膜，使得製膜液因濃度改變形成不穩定狀態，最後發生結晶或液-液相分離，使得高分子分離析出，經由乾燥處理將溶劑、非溶劑等小分子物質抽出便形成多孔型薄膜【12,13】。

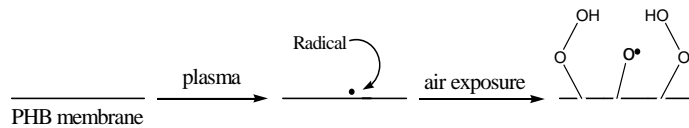
### 3.3 薄膜之電漿接枝表面改質

一般氣體分子為電中性之絕緣狀態，然而在強大的電場中，可將其激發產生電子、離子與自由基等，稱之為電漿狀態【14】。薄膜之電漿接枝聚合乃是將薄膜置於電漿轟擊下，使其表面活化產生自由基，然後再與所欲接枝之單體接觸，引發自由基聚合反應，使薄膜表面接枝一層極薄的聚合物，進而改變薄膜的表面性質。薄膜電漿改質的應用十分廣泛【15】，如製作親水表面、防腐蝕性表面、生醫薄膜及各種分離程序薄膜等。一般來說使用電漿來改質薄膜具有以下的優點【16,17】：(a)可生成一均勻無孔的薄膜覆蓋在基材的表面；(b)對於基材附著良好，不會脫落；(c)所形成的聚合物具有相當高的安定性；(d)對於基材而言僅對其表面加以改質，不會影響基材本身的性質及結構。

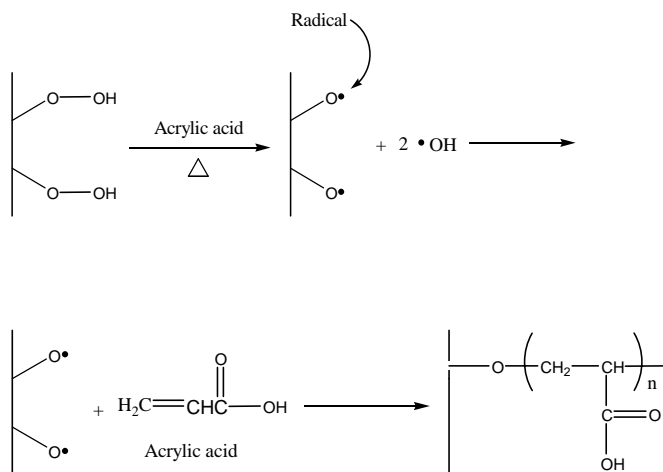
多孔型PHB薄膜將作為電漿接枝聚丙烯酸之基材，而聚丙烯酸則可用來固定離胺酸。電漿接枝聚丙烯酸之反應機制示於Figure 1，首先將PHB薄膜照射電漿生成自由基，接著將薄膜曝於空氣中，產生過氧化基(Figure 1 (A))，然後將此薄與丙烯酸接觸引發聚合反應，此反應可分為兩種機制【18~20】，其中Figure 1 (B)所示為加熱分解法，此方法乃是將薄膜浸入丙烯酸中並加熱到一定溫度，此時薄膜表面的過氧化基中CO-OH鍵發生斷裂而產生CO·自由基，此自由基再攻擊其他丙烯酸單體，完成接枝反應；Figure 1 (C)所示為氧化還原分解接枝反應，此方法將薄膜浸漬於丙烯酸溶液中，再添加適量的亞鐵離子( $\text{Fe}^{2+}$ )，於常溫下亞鐵離子會將薄膜表面的過氧化基還原成自由基CO·，此自由基再攻擊丙烯酸單體完成接枝反應，而亞鐵離子在接枝反應中，做為氧化還原反應的還原

劑，同時也做為抑制單體自身聚合反應的抑制劑，所以在單體溶液中添加適量的亞鐵離子，一方面可以減緩欲接枝單體的自身聚合，一方面還可以還原過氧化物使產生自由基，更有利接枝反應的進行。本計畫將同時採用上述兩種接枝機制，即在丙烯酸溶液中加入適量亞鐵離子並同時加熱，來進行聚合反應。

(A)



(B)



(C)

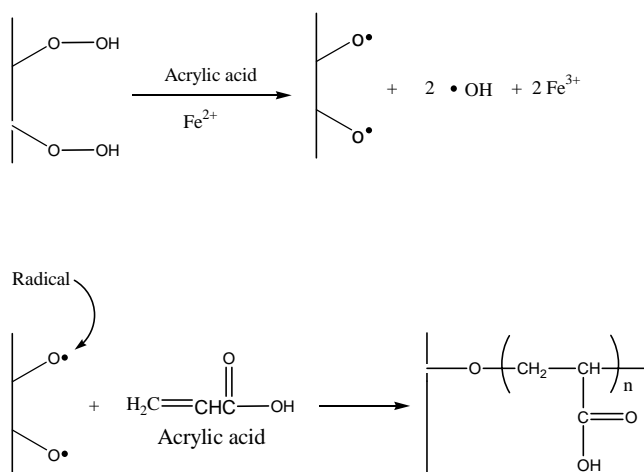


Figure 1 電漿誘導接枝聚合反應示意圖。

### 3.4 薄膜固定離胺酸

在本計畫中為了有效固定離胺酸，採用了 Kang 等所提出的方法【21,22】，選用水溶性二亞胺基碳(water soluble carbodiimide；WSC)作為蛋白質連結劑(coupling reagent)【23,24】；WSC 的種類繁多，而本計畫選擇 1-ethyl-3 (3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDAC)作為連結劑，其作用原理示於 Figure 2【25,26】，首先薄膜表面上聚丙烯酸之羧酸基與 EDAC 反應予以活化，如 Figure 2 (A)所示，然後再與離胺酸之胺基反應形成醯胺鍵結，而離胺酸為一已知可促進骨母細胞成長之胞外基質(extracellular matrices, ECM)。

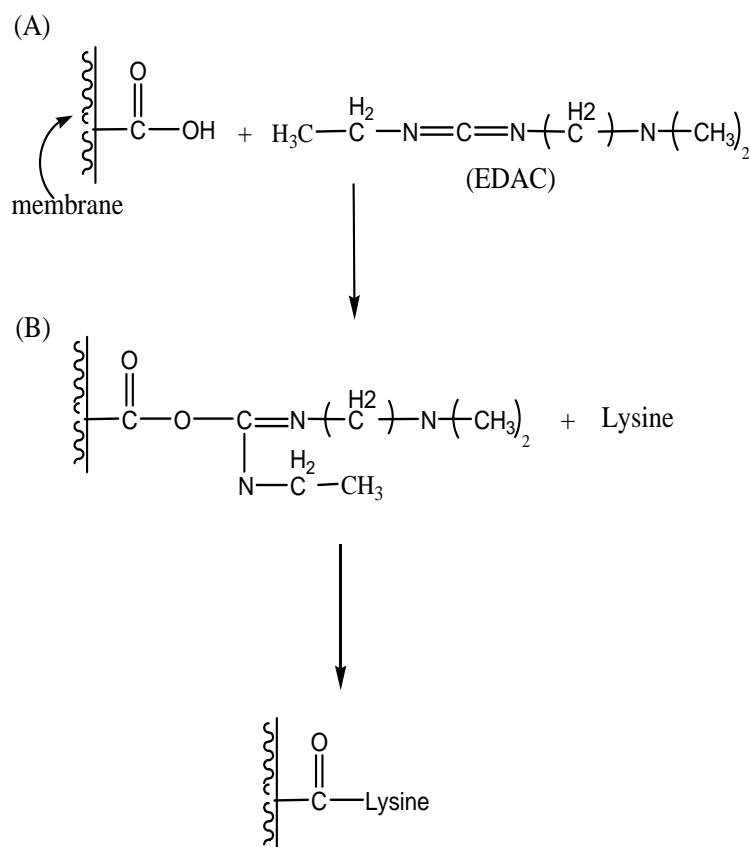


Figure 2 薄膜表面上之聚丙烯酸與離胺酸反應。(A)羧基活化；(B)酸酐與離胺酸之胺基反應。

### 3.5 薄膜之骨母細胞培養

身體之骨組織常因外在因素(如重傷)或病變(如腫瘤移除、骨髓炎)等因素而產生骨

缺陷(bone defect)，除非骨骼再生恢復原功能，否則於短時間之內無法癒合，因此其治療方式通常利用骨頭移植手術來填補缺陷。但此方法卻因自體和異體的骨頭供應而有所限制。金屬材料就大小、支撐、機械性質等而言是良好的選擇，但卻有腐蝕問題，且組織無法與之鍵結，陶瓷材料雖具有良好的生物相容性亦無毒性及免疫問題【27】，然而骨傳導性通常只發生在鄰近骨頭處，且陶瓷本身不具有骨新生能力【28】，故近年來發展出利用高分子作為誘導組織重建(guided tissue regeneration)之材料【29~33】。所謂誘導組織重建即是在骨缺陷處以高分子薄膜將傷口覆蓋，一方面隔離纖維細胞結締組織在傷口生長，使骨組織癒合，另一方面高分子薄膜作為骨組織再重建之鷹架。

本計畫與輔大生科所周秀慧教授合作細胞培養之技術，以尋找適合骨母細胞生長的环境，並對骨母細胞培養在人造環境所引發的相關問題進行探討，例如觀察在不同孔隙結構或化學組成之薄膜上，對骨母細胞之貼附及生長影響。

### 3.5.1 材料影響細胞生長的因素

根據近年來的文獻報導，在材料上培養細胞時，影響其生長的因素主要可分為以下四點：

(1) 材料本身的性質：材料之生物適合性是首要的考慮，文獻上大多利用已經應用於人體的生醫材料作為研究的對象，如水膠(hydrogel)【34】、洋菜膠(agarose)【35】等。其他如 poly(vinylidene fluoride)(PVDF)【36】、poly(lactide)【37】、polyurethane(PU)【38】等合成高分子也常被用作培養細胞之基材。

(2) 基材的結構：以基材之孔隙大小影響最大。Woerly 等在 poly(glyceryl methacrylate)等材料中加入膠原蛋白(collagen)作為細胞貼附和生長的基材，發現當基材的孔隙直徑介於  $4\text{--}20\ \mu\text{m}$  的時候，細胞生長得最好【39】，藉由此控制孔洞的大小，平板狀的膠質層可以用來做為觀察神經細胞在體外三度空間的生長，並可用來做為三度空間的細胞培養及再生的結構物。

(3) 促進生長的物質：最常用的是膠原蛋白(collagen)、纖維結合素(fibronectin)、昆布胺



酸(lammin)、聚鳥胺酸(polyornithine)、聚離胺酸(polylysine)等。就塗佈在基材表面來培養細胞而言，聚離胺酸的效果較其他為佳。

(4) 帶電性的影響：許多研究都有所探討，Woerly 等利用 GMA 材質以(ethylene glycol dimethacrylate, EGDMA)為交聯劑並加入(ethyl methacrylate, EMA)，使材料帶正電性或陰電性，發現帶陰電性材料之神經細胞生長情形較佳【39】，但是亦有其它的研究發現帶正電性亦有促進生長的情形【40】，所以只能說若表面官能基帶有正電性或負電性或以正電流或負電流加以刺激都可以促進細胞的生長，但是到底是何種電性較佳則尚無定論。

### 3.5.2 材料表面改質與細胞生長的關係

在人體中的活細胞需在細胞外基質(extracellular matrices, ECM)上進行貼附和生長，而 ECM 大部分是由蛋白質和聚葡萄糖胺(glycosaminoglycans)所構成，因此如何在生醫材料的表面製造類似 ECM 的環境，便是生醫材料的一大考驗。

將材料表面塗佈促進細胞生長的物質(貼附因子)是提供 ECM 環境最簡單的作法，事實上也的確具有效果，但是貼附因子價格昂貴，並不適合大量使用，而且塗佈效果的一致性與實驗再現性不佳，再加上塗佈的貼附因子會隨著植入的時間漸長而隨著體液流失掉，無法長期附著因此現在許多研究都朝向表面改質，以得到穩定的材料【41】，如 Beyer 將高分子 poly[(1-methylvinyl isocyanate)-alt-(maleicanhydride)]以胺基矽甲烷化(aminosilanized)的方式來接枝昆布胺酸(laminin)的片段以及 aminopoly(ethylene oxide)(APEG)，以改善海馬趾的細胞之生長【42】。

多數的改質策略是先從材料親疏水性方面著手探討，若材料對於蛋白質的吸附力好，便能夠使表面佈滿 ECM 蛋白質，使細胞能夠貼附於此。如 Iwasaki 曾經以磷脂(phospholipid)類高分子 poly[ $\omega$ -methacryloyloxyalkyl phosphorylcholine (MAPC)]接枝於聚乙烯(polyethylene, PE)，以增加其表面的親水性，來促進 fibronectin 與纖維母細胞(fibroblast)的貼附生長【43】，Kleinfeld【44】等曾經以胺類的衍生物鏈結在基材表面以

促進神經細胞的貼附。

聚離胺酸(poly-D-lysine)為一分子量約 70000-150000 的高分子，對細胞而言是非常有助於其貼附的 ECM。聚離胺酸是由離胺酸所聚合而成，此二者都具有適合細胞貼附的胺基(amine group)，因此本研究在薄膜表面上固定離胺酸，以模擬出類似聚離胺酸塗佈效果的生醫高分子材料。

## 4. 實驗

### (1) 材料

#### (A) 薄膜製備

聚羥基丁酯(Poly(3-hydroxybutyrate)；PHB)：Aldrich， $T_m = 172^{\circ}\text{C}$

氯仿(Chloroform)：Acros，99.8%， $M = 119.38\text{ g/mol}$ ， $mp = -63^{\circ}\text{C}$ ， $bp = 61^{\circ}\text{C}$

乙醇(Ethanol)：Fluka，99.8%， $M = 46.06\text{ g/mol}$ ， $mp = -144^{\circ}\text{C}$ ， $bp = 78^{\circ}\text{C}$

正己烷(Hexane)：六合化學，95wt%工業級， $bp = 69^{\circ}\text{C}$ ， $d = 0.659\text{ gm/ml}$

#### (B) 薄膜電漿接枝聚丙烯酸

丙烯酸(Acrylic acid)：Acros，99.5%， $M = 72.06\text{ g/mol}$ ， $mp = 13^{\circ}\text{C}$ ， $bp = 139^{\circ}\text{C}$

氫氧化鈉(Sodium hydroxide)：Acros， $M = 40.00\text{ g/mole}$ ， $mp = 12^{\circ}\text{C}$ ， $bp = 140^{\circ}\text{C}$

鹽酸水溶液(Hydrochloric acid solution，1N)：Acros， $mp = -25^{\circ}\text{C}$ ， $bp = 85^{\circ}\text{C}$

硫酸亞鐵(Ammonium Iron(II) sulfate hexahydrate，Mohr's salt)：Junsei Chemical

Co. Ltd.， $mp = 100^{\circ}\text{C}$ ， $d = 1.8600\text{ mg/ml}$

其他：蒸餾水、氬氣

#### (C) 固定離胺酸

活化劑(1-ethyl-3-(3-diethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride，EDC)：Acros， $M = 191.70\text{ g/mole}$ ， $mp = 100-114^{\circ}\text{C}$

離胺酸(L-Lysine)：Sigma USA，98%， $M = 182.7\text{ g/mole}$

緩衝液：磷酸緩衝溶液(Phosphate buffer solution，PBS)

其它：蒸餾水

#### **(D) 培養骨母細胞**

骨母細胞(hFOB 1.19)：human osteoblast cell line

乳糜胰蛋白酶(Trypsin type III)：Sigma，M = 23000 g/mole

EDTA(Ethylene diaminetetra-acetic acid)：Sigma，99.99%，M = 292.2 g/mole

胎牛血清(Fetal Bovine Serum；FBS)：Sigma，cell culture, tested

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylterazolium bromide)：Sigma，>97%，

戊二醛(Glutaraldehyde)：Sigma，25% by weight in water，mp = -6°C，bp = 101°C

鉻酸(Osmium tetroxide)：Sigma，99.99%，M = 254.2 g/mole，mp = 41~44°C

其他：乙醇、磷酸緩衝溶液

### **(2) 薄膜製備**

#### **(A) 浸漬沈澱法製備薄膜**

利用浸漬沈澱法製備 PHB 薄膜，將 PHB 加入氯仿中，加溫溶解攪拌使其溶解，取出製膜液將其靜置於室溫下 2 個小時，以除去製膜液中之氣泡；將適量製膜液以刮刀塗佈於載體上，然後將其浸入沉澱槽中，待成膜後，將薄膜取出浸入乙醇中 24 小時，再浸入正己烷中 24 小時，利用正己烷將殘留在薄膜孔洞中之乙醇置換出來，並利用正己烷之高揮發性，防止薄膜結構在乾燥過程中的塌陷，浸泡完畢後，將薄膜取出乾燥之。

#### **(B) 乾式法製備薄膜**

如前所示配置適當濃度之製膜液，以刮刀塗佈於載體上，將其置於室溫中一段時間(約十分鐘)，待薄膜形成後，將其升溫至 50 °C 乾燥並抽真空以除去殘餘溶劑，然後測試其性質。

### **(3) 薄膜電漿接枝聚合**

首先以減壓蒸餾法將丙烯酸中微量之聚合抑止劑(MEHQ)去除，再將純化後之丙烯

酸配製成所需濃度之水溶液並除氧待用。將PHB薄膜放入電漿反應器中(如圖四所示)；將反應室抽真空至  $2 \times 10^{-2}$  torr 除氧二十分鐘，通入氬氣使壓力保持在 0.4 torr，打開電漿使薄膜的表面產生自由基，然後將其曝於空氣中使自由基轉換為過氧化基，將薄膜放入配製好的丙烯酸溶液中，升溫(約  $50 \sim 80^\circ\text{C}$ )反應，待反應完成後取出，以蒸餾水反覆清洗，烘乾備用。

將未改質薄膜於  $50^\circ\text{C}$  乾燥，並使用 6 位數天平秤重紀錄其重量( $w_0$ )，再將表面改質處理後之薄膜清洗烘乾後秤其重量( $w_1$ )。

接枝密度 = (改質後  $w_1$  - 改質前  $w_0$ ) / 薄膜面積

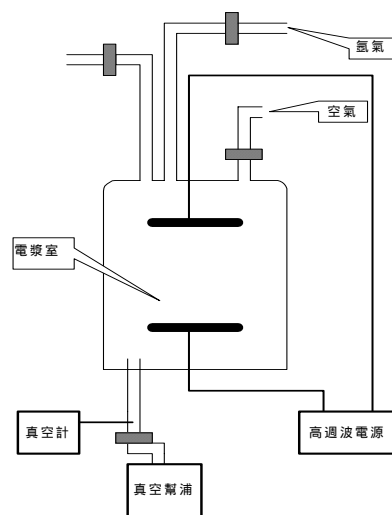


Figure 3 鐘罩式電漿反應器示意圖

#### (4) 離胺酸與聚丙烯酸反應

將已接枝丙烯酸的薄膜放入活化劑中(EDC 溶於 PBS 緩衝溶液中)，使丙烯酸上的羧酸基轉變成酸酐的形式，活化劑 pH 調整在酸性範圍，待反應完成後，用 PBS 緩衝溶液清洗。將活化完成的接枝膜置於離胺酸的 PBS 緩衝溶液中反應，反應完成後取出，用 PBS 緩衝液清洗。改質過後的薄膜陰乾後置入乾燥箱中保存。

#### (5) 改質薄膜之檢測分析

##### (A) UV 比色法定量

首先將 acid orange 7 用 0.001N 氫氧化鈉水溶液(pH 11)配製成不同濃度之 acid orange

7 水溶液，分別去做 UV 吸收值(Acid orange 7 在 UV 波長 485nm 處有最大的吸收值，如 Figure 4 所示)，以製作 acid orange 7 之檢量線(Figure 5)，下述測量方式是 Acid Orange 7 分子與表面上的氨基形成離子錯合物【45】。

將固定Lysine後之PHB薄膜靜置於  $5 \times 10^{-4}$  M Acid Orange 7 水溶液中(pH 3)，於 25 °C 下反應 6 小時，使Acid Orange 7 與Lysine的NH<sub>2</sub>形成錯合物，再以  $1 \times 10^{-3}$  M鹽酸水溶液(pH 3)反覆沖洗薄膜表面並靜置 30 分鐘，以去除未形成錯合物的染料劑，並避免吸附之染劑因pH值改變脫附出來，再將薄膜置於定量之  $1 \times 10^{-3}$  M氫氧化鈉水溶液(pH 11)中，以震盪機固定 100 rpm下震盪 24 小時後，使吸附於薄膜上之染劑脫附，吸取適量溶液於石英槽中以UV分光光度計，測其在 485nm之光學密度值(optical density; O.D.)。

例如，以 5ml的  $1 \times 10^{-3}$  M氫氧化鈉水溶液脫附 1cm<sup>2</sup> 薄膜上之acid orange 7 染劑，取出約 2ml測其UV吸收度，當吸收度為 0.05 時，代入Figure 5 中所列之方程式，可得其acid orange 7 染劑濃度  $6.632 \times 10^{-7}$  M，而acid orange 7 可與lysine以 1:1 比例反應，因此可經由下式得知lysine固定量。

$$\begin{aligned} \text{Immobilization yield of lysine } (\mu\text{g}/\text{cm}^2) &= \\ 6.632 \times 10^{-7} \text{ M} \cdot 0.005 \text{ (L)} \cdot 146 \text{ (g/mol)} / 1(\text{cm}^2) &= 0.48 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \end{aligned}$$

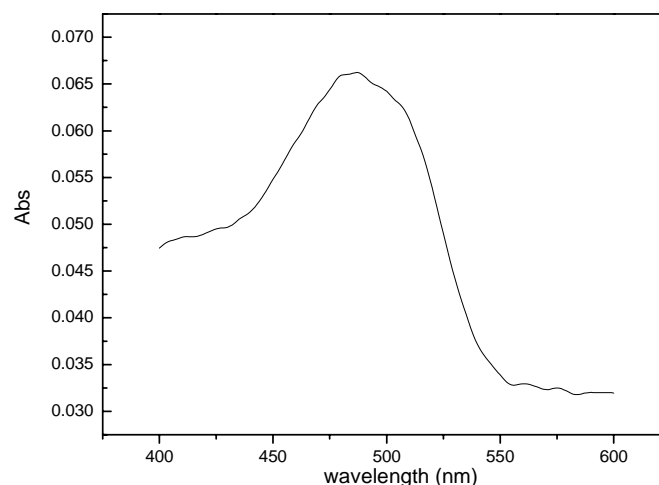


Figure 4 UV spectrum of acid orange 7 at concentration  $1.56 \times 10^{-6}$  M.

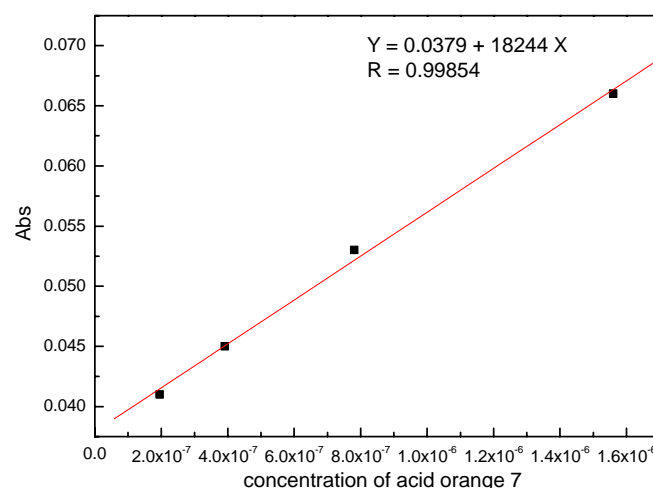


Figure 5 Calibration of acid orange 7

## (B) 衰減全反射儀 (ATR)

以衰減全反射式紅外線光譜儀分析薄膜表面官能機吸收峰之變化情形，吸收的光譜是在中紅外光區（波長  $4000\text{-}650\text{cm}^{-1}$ ）。

## (C) 化學分析電子光譜 (ESCA)

ESCA 光譜可以提供距離表面小於  $50\text{\AA}$  深度的化學鍵成份資料，掃描區域約為  $800\mu\text{m}$  見方，由此可以得知薄膜表面的元素定量分析。

## (D) 表面接觸角

將欲測試之薄膜剪裁試當大小，真空乾燥後將薄膜貼在載玻片上，以接觸角觀測儀量測純水與薄膜之接觸角。

## (6) 骨母細胞培養

### (A) 初代之骨母細胞培養

實驗所使用的骨母細胞為細胞株(hFOB 1.19)。細胞培養基乃為市售的DMEM/F12培養液(外加入  $2\text{ mM}$  L-glutamine,  $10\text{ mM}$  HEPES,  $100\text{ U/ml}$  penicillin,  $100\text{ mg/ml}$  streptomycin)，混和  $10\%$  胎牛血清FBS(Fetal Bovine Serum)調配而成，細胞株及培養基混和均勻後放入細胞培養箱(Incubator,  $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{ CO}_2$ )中。

## (B) 薄膜前處理

將薄膜裁剪成  $1\text{ cm}^2$  的大小，置於 24 井培養盤中，並用 Teflon 環將薄膜固定，加入 70% 酒精浸泡約一天，並同時以 UV 燈照射，以達到徹底滅菌的效果，再以 PBS 緩衝溶液反覆沖洗，將酒精除去。

## (C) 細胞計數

細胞計數所使用的計數盤為血球計數器(Hemocytometer)。計數時，先將培養液與細胞混和均勻，以微量分注器自離心管中吸取  $100\text{ }\mu\text{l}$  細胞溶液，注入試樣管中，同時吸取 trypan blue  $100\text{ }\mu\text{l}$  將兩者混和，並以微量分注器吸抽多次使之均勻混和，而後將細胞溶液滴於計數盤與蓋玻片的空隙中進行細胞計數。由於 trypan blue 會將死細胞染成藍色，而活細胞則無法染上顏色，故於計算細胞時可於顯微鏡下，算出計算盤四角的活細胞數目(N)，而總細胞數目可由下式求得：

$$\text{Total cell number (cell/ml)} = (N/4) \times (\text{稀釋倍數}) \times 10^4$$

本實驗採用稀釋倍數為 2 倍。

## (D) 薄膜的細胞培養

自細胞培養箱中取出已培養完成的骨母細胞細胞株，先去除培養液後，以 PBS 溶液反覆沖洗，以確保培養基完全去除。然後以胰蛋白酶溶液 (0.25% Trypsin) 加入培養盤中，蓋滿整個培養盤，並將細胞由培養皿中打下，然後加入培養基稀釋，以降低胰蛋白酶溶液對細胞的傷害，之後置於離心管中離心 (1500 rpm,  $20^\circ\text{C}$ , 5min)，離心完成後去除上層澄清液，保留管底白色部分的細胞，然後加入適量培養液，並進行細胞計數。

將細胞種入含有薄膜試片的細胞培養皿中，而細胞數目控制為  $6 \times 10^4/\text{ml}$ ，然後放進細胞培養箱中培養，每個培養基為 1ml / well，每組薄膜試片均重覆 4 次。在培養箱中分別 1 天、2 天、3 天、4 天後取出，移除培養基，先以 PBS 清洗約兩次，再用以下列方式進行評估細胞的生長與貼附。

### (E) 評估骨母細胞生長情形

(a) **細胞活性試驗(MTT test)**: 分別經過不同時間培養之骨母細胞乃是以 MTT 試驗來決定細胞的存活率。將培養盤中的培養液抽出，並以 PBS 溶液沖洗，在每個 well 中加入 500  $\mu$ l 培養基及濃度為 2mg MTT/ml PBS 溶液 75 $\mu$ l，在 37°C 下培養 3 小時，加入 500  $\mu$ l IPA 來溶解藍色結晶，並放置在搖盪器上 15 分鐘使其均勻。從溶液中吸取 200  $\mu$ l 注入 96 井細胞培養盤中並重複 3 次，再用 ELISA 在 570nm 波長讀取吸收值。

(b) **掃描式電子顯微鏡觀察**: 從培養箱裡將培養皿拿出，去除培養液，先用 PBS 清洗，再以戊二醛(Glutaraldehyde)固定細胞，再以臨界點乾燥(Critical Point Dryer, CPD)處理以防細胞變形，之後以離子植佈機將其表面鍍金處理，然後以掃描式電子顯微鏡觀察細胞形態。臨界點乾燥前所作固定步驟，目的在於將薄膜試片上細胞的水份以酒精置換而保存細胞形態。詳細固定步驟如下：

- |                   |      |                  |
|-------------------|------|------------------|
| 1. Glutaraldehyde | 2.5% | 1hr/PBS          |
| 2. PBS Washing    |      | 15min $\times$ 2 |
| 3. 60% 乙醇         |      | 10 min           |
| 4. 70% 乙醇         |      | 10 min           |
| 5. 80% 乙醇         |      | 10 min           |
| 6. 90% 乙醇         |      | 10 min           |
| 7. 100% 乙醇        |      | 10 min           |



## 5. 結果與討論

92 年度我們製備不同孔隙結構之 PHB 薄膜，並於多孔薄膜表面進行電漿改質，接枝聚丙烯酸，賦予 PHB 薄膜之功能性，而本年度我們將離胺酸固定於已接枝聚丙烯酸之 PHB 薄膜，進而觀察在不同孔隙結構或化學組成之薄膜上，骨母細胞(hFOB 1.19)之貼附及生長情形，以瞭解此二變因對細胞生長之影響。

上年度本計畫所研製之 PHB 薄膜，其成膜條件與薄膜強度整理於 Table 1，Figure 6 顯示各薄膜之孔隙結構，Figure 6-(a)為Film的上表面，可發現其緻密而無孔隙，而Figure 6-(b)~(d)分別為薄膜M<sub>80</sub>、M<sub>100</sub>與M<sub>120</sub>之上表面，三者皆為多孔型式。由於上述薄膜之孔隙度差異頗大，故適合用於研究材料表面結構對細胞培養之影響，而其中M<sub>100</sub>因孔隙度過大，使得抗張強度過低(38 gf/mm<sup>2</sup>)不利作為生醫材料，因此本研究僅選擇Film、M<sub>80</sub>、M<sub>120</sub>三者為細胞培養之基材。

Table 1 Preparation conditions and tensile strength of PHB membranes

Code	Dope dissolution temperature (°C)	Bath	Method	Tensile strength at break (gf/mm <sup>2</sup> )
Film	80	Air	Dry method	605
M <sub>80</sub>	80	Ethanol	Wet method	109
M <sub>100</sub>	100	Ethanol	Wet method	38
M <sub>120</sub>	120	Ethanol	Wet method	63

Dope: 8 % PHB in chloroform

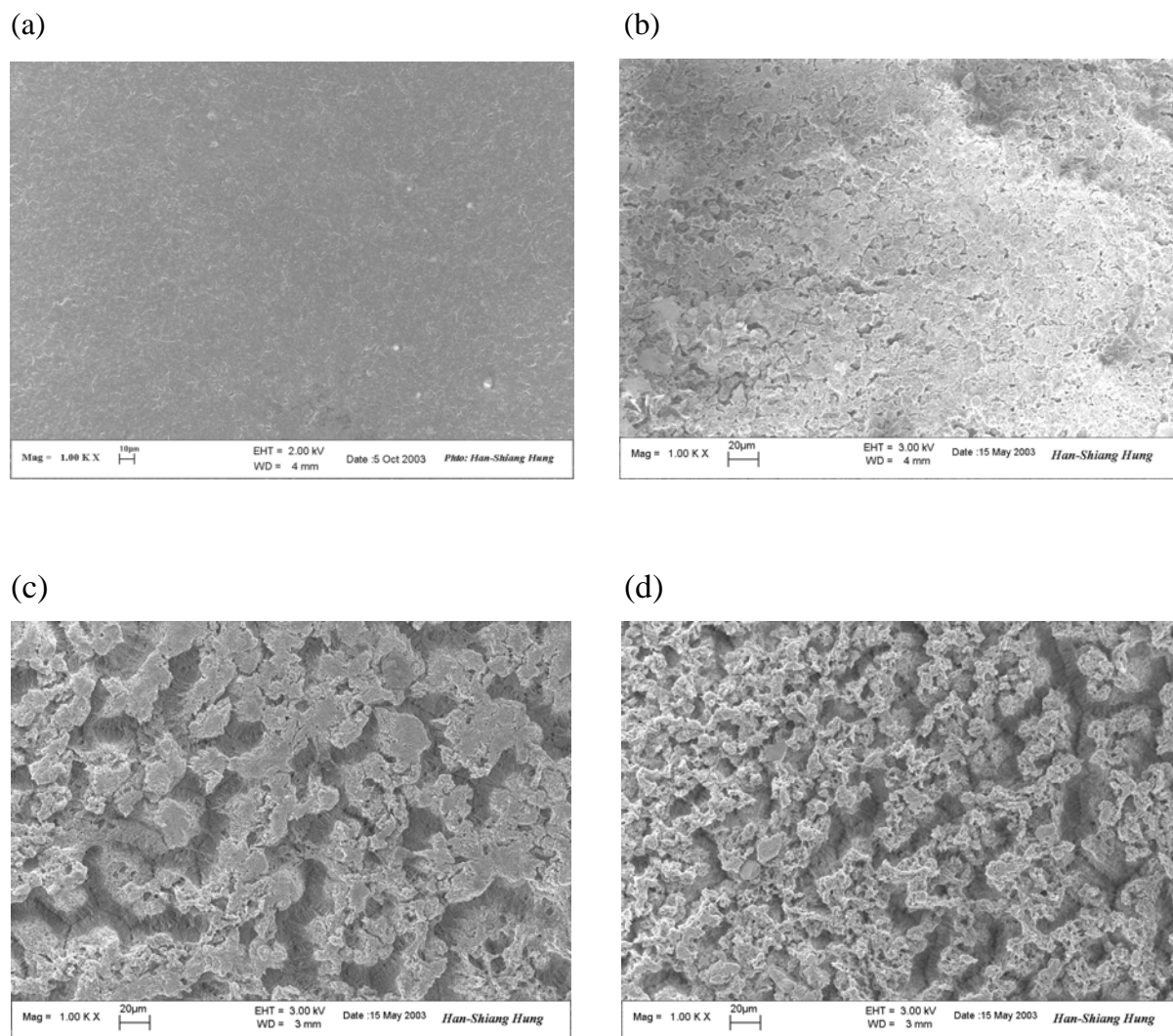


Figure 6 SEM photomicrographs showing the morphologies of the top surfaces of PHB membranes. (a) Film ; (b) M<sub>80</sub> ; (c) M<sub>100</sub> ; (d) M<sub>120</sub>.

## 5.1 PHB 薄膜電漿接枝聚丙烯酸

Film與多孔薄膜M<sub>80</sub>接枝聚丙烯酸之結果如Figure 7 所示(關於Film的詳細接枝量資料，如電漿處理時間、電漿功率大小、接枝反應時間、單體濃度對接枝量之影響，請參閱 92 年成果報告)，可發現M<sub>80</sub>之接之量不論接之時間長短皆大於Film，這主要是因為M<sub>80</sub>具備較大的表面積所致。本研究將lysine固定於4種不同聚丙烯酸接枝量之PHB薄膜上，其編號示於Table 2。

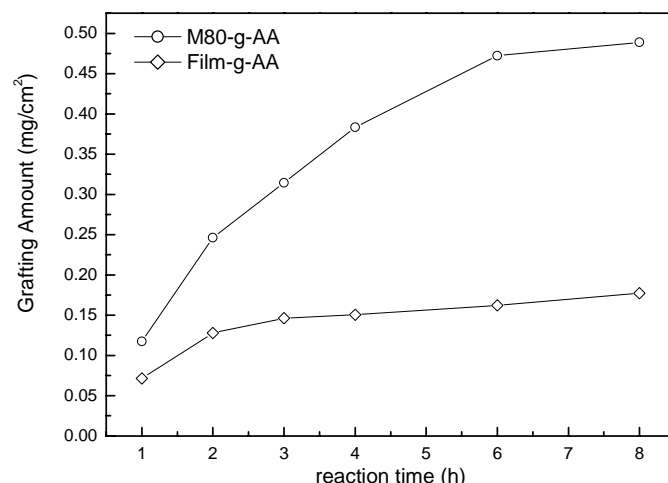


Figure 7 Effect of morphology and reaction time on the grafting yields of poly(acrylic acid) on PHB membranes. RF power = 50 W; Plasma treatment time = 90 sec; Monomer concentration = 20 % (AA);  $\text{Fe}^{2+} = 1.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ .

Table 2 Grafting yields of poly(acrylic acid) on film and membrane M<sub>80</sub>.

Code	Reaction time (h)	Grafting yield (mg/cm <sup>2</sup> )	Grafting amount of -COOH (mmole/cm <sup>2</sup> )
Film-g-LAA	1	0.07	$1 \times 10^{-3}$
Film-g-HAA	6	0.16	$2.25 \times 10^{-3}$
M <sub>80</sub> -g-LAA	1	0.12	$1.64 \times 10^{-3}$
M <sub>80</sub> -g-HAA	6	0.47	$6.56 \times 10^{-3}$

## 5.2 PHB-g-AA 薄膜與離胺酸反應之檢測分析

### 5.2.1 衰減全反射儀 (ATR) 之定性分析

Figure 8 為純PHB薄膜(線a)、接枝聚丙烯酸薄膜(線b)與固定lysine薄膜(線c)的FTIR圖譜，可發現經接枝聚丙烯酸與固定lysine後之薄膜在  $3400 \text{ cm}^{-1}$  處皆有一OH官能基吸收峰，在線b靠近  $1560 \text{ cm}^{-1}$  處可發現聚丙烯酸的非對性 $\text{COO}^-$ 吸收峰，在線c靠近  $1560 \text{ cm}^{-1}$  與  $1645 \text{ cm}^{-1}$  兩處有CO-NH 之醯胺基吸收峰，但前者與poly(acrylic acid)之 $\text{COO}^-$ 吸收峰重疊，因此僅可由  $1645 \text{ cm}^{-1}$  處微弱的訊號，判斷微小的lysine固定量。

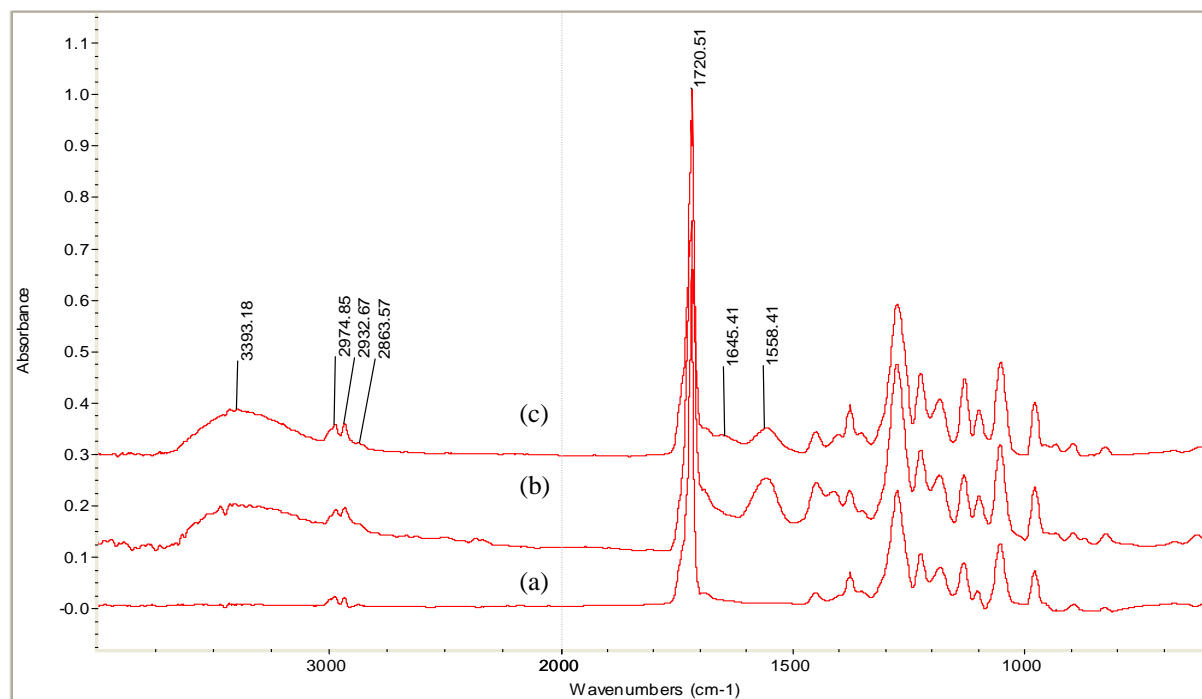


Figure 8 FTIR spectra of various membranes. (a)M<sub>80</sub>, (b)M<sub>80</sub>-g-HAA, (c)lysine immobilized M<sub>80</sub>-g-HAA, immobilization yield = 0.55  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ .

## 5.2.2 UV 比色法定量分析

### (A) EDAC 濃度對離胺酸固定量之影響

EDAC的濃度會影響聚丙烯酸의活化程度，進而接影響離胺酸的固定量。由Figure 9中可以觀察出隨EDAC濃度之增加，離胺酸接枝量也隨之增加，但是當濃度到達  $3 \times 10^{-2} \text{M}$  後，固定量之增加即趨緩和，顯示活化劑的添加已經達到飽和狀態，即使濃度再增加也不能大幅度增加離胺酸的固定量，而當不使用EDAC時，仍可測得  $0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的lysine固定量，而此固定量可能是M<sub>80</sub>-g-HAA的羧酸基與lysine的胺基彼此間的物理吸附現象。

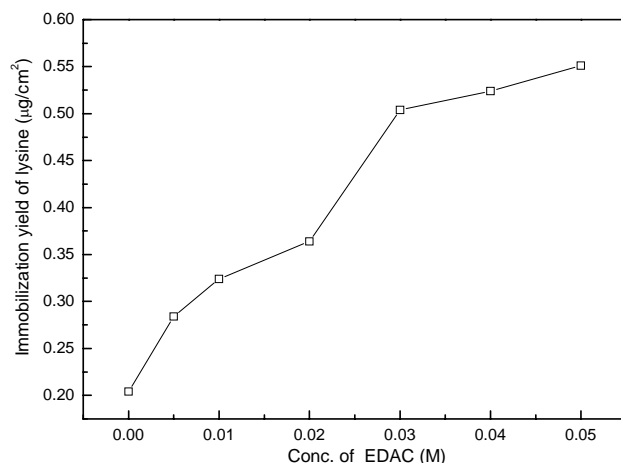


Figure 9 Variation of lysine immobilization yield with EDAC concentration on membrane M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation at pH 3 for 6 hr; lysine immobilization at pH 10 for 24 hr, lysine concentration = 0.05 M.

#### (B) EDAC 活化之 pH 值對離胺酸固定量之影響

EDAC 活化過程中，酸鹼值對丙烯酸之活化程度有相當之影響，在酸性環境下有利於 EDAC 與羧基反應生成 O-acylisourea 衍生物，進而產生之後的縮合反應。由 Figure 10 中可以觀察出在 pH 3 時有最高固定量，隨著 pH 值再提高固定量則下降，而在過酸的環境下反而會抑制活化反應進行，而導致 lysine 的固定量反而下降。

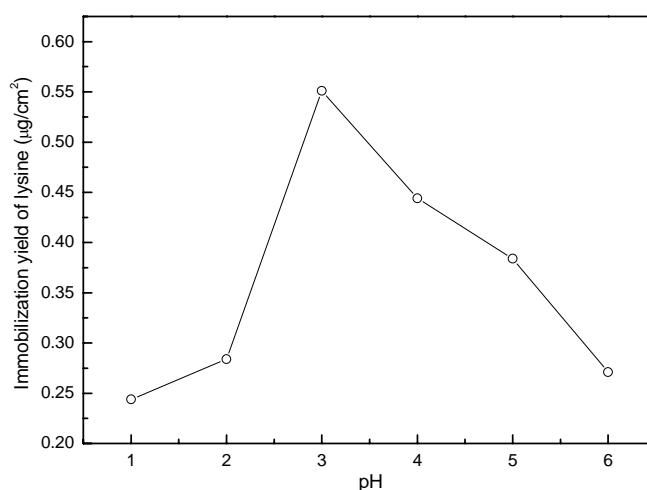


Figure 10 Variation of lysine immobilization yield with pH of EDAC activation on membrane M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation time = 6 hr, EDAC concentration = 0.05 M; lysine immobilization at pH 10 for 24 hr, lysine concentration = 0.05 M.

### (C) EDAC 活化時間對離胺酸固定量之影響

EDAC 活化聚丙烯酸時間之長短將影響活化基團的數目，進而改變離胺酸的固定量，由 Figure 11 可以觀察出，當活化時間到達 6 小時後 lysine 固定量趨於平緩，增長活化時間無法明顯的增加 lysine 固定量，因此 EDAC 的有效活化時間約為 6 小時。

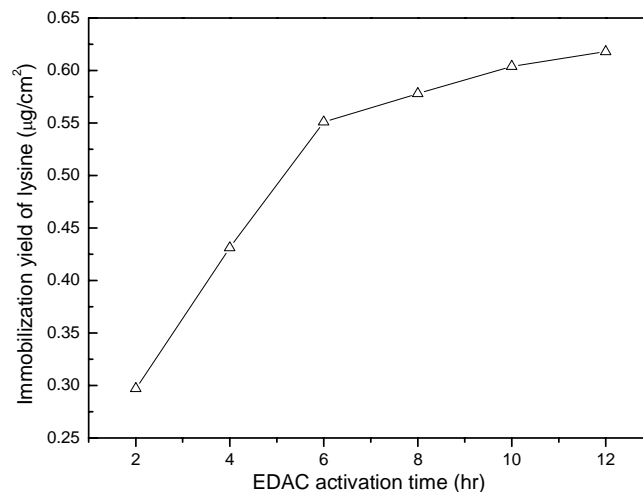


Figure 11 Variation of lysine immobilization yield with EDAC activation time on membrane M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation at pH 3, EDAC concentration = 0.05 M; lysine immobilization at pH 10 for 24 hr, lysine concentration = 0.05 M.

### (D) Lysine 濃度對固定量之影響

Lysine 的濃度是影響固定量的最重要因素，如 Figure 12 所示當 lysine 濃度達到  $1 \times 10^{-2} \text{ M}$  後，於 PHB 薄膜上的 lysine 固定量即趨於穩定，而最大固定量僅為  $0.55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，由此可知本實驗之固定化反應，並未能夠將接枝上的羧酸基(-COOH)完全反應。

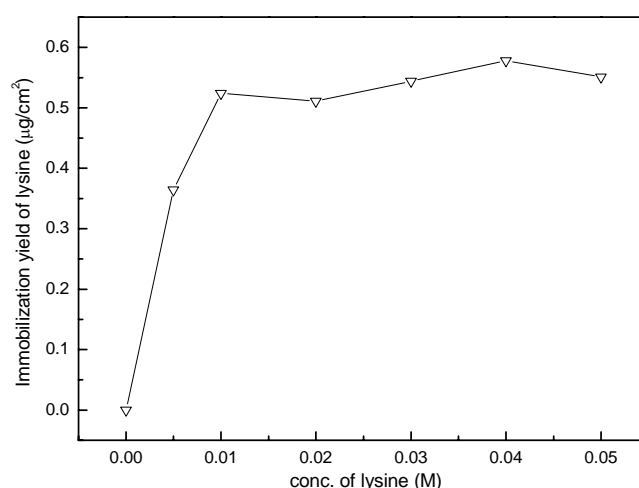


Figure 12 Variation of lysine immobilization yield with lysine concentration on membrane M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation at pH 3 for 6 hr, EDAC concentration = 0.05 M; lysine immobilization at pH 10 for 24 hr.

#### (E) pH 值對離胺酸固定量之影響

如Figure 2-(B)反應機構所示，lysine是利用其一級胺基(-NH<sub>2</sub>)上的孤立電子對與被EDAC活化之羧酸基反應，而lysine上的胺基與羧酸基會隨酸鹼度的變化而以不同形式存在【46】；如Figure 13 所示，lysine於酸性環境下 $\alpha$ 胺基與 $\delta$ 胺基皆呈質子化銨基-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>形式，此形式-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>不帶孤立電子對不利於進行親核取代反應，因此如Figure 14 所示於酸性環境下lysine的固定量明顯較低，到中性環境後lysine固定量趨於平緩且逐步趨於最大固定量。

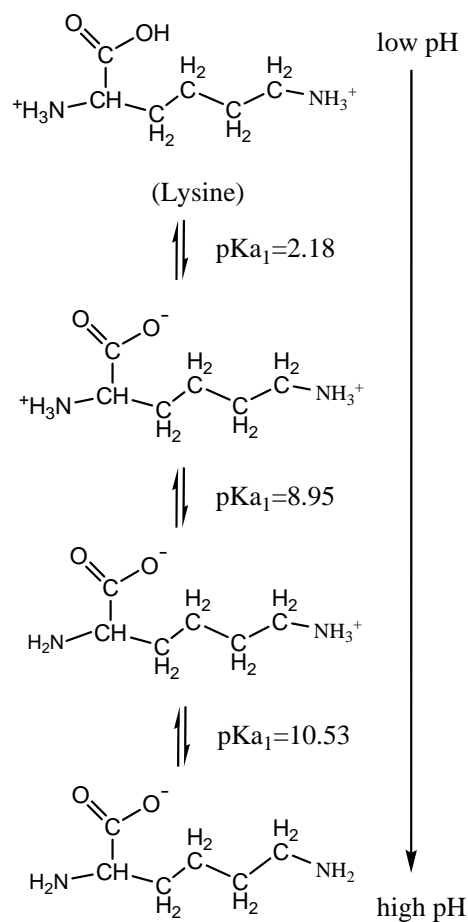


Figure 13 Lysine氨基酸官能基電性與pH值的關係示意圖

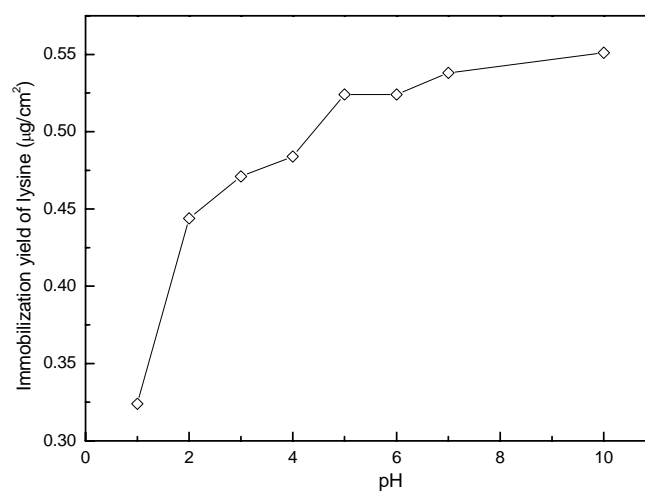


Figure 14 Variation of lysine immobilization yield with lysine concentration on M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation at pH 3 for 6hr, EDAC concentration = 0.05 M; lysine immobilization 24hr, lysine concentration = 0.05 M.



#### (F) 離胺酸固定化時間之影響

Figure 15 可觀察出 lysine 固定量是隨著反應時間增加至 12 小時後趨於平緩，即使增加固定化時間對於 lysine 的固定量並無太大的增加，而在較短的固定化時間(<12 小時)並無法有效固定 lysine，因此並無法於短時間內達到有效的 lysine 固定量。

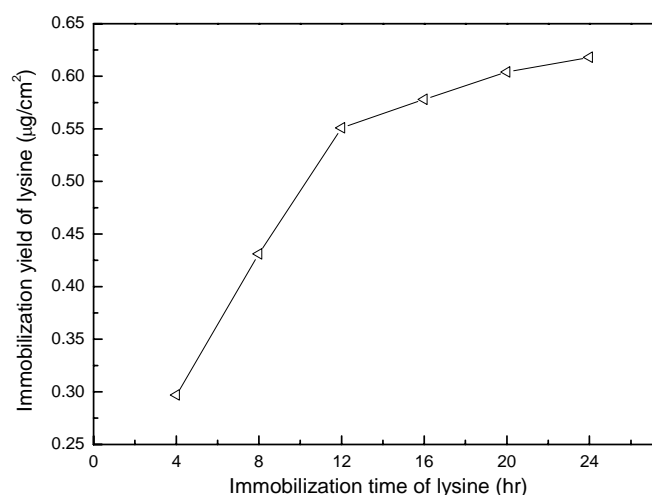


Figure 15 Variation of lysine immobilization yield with immobilization time on M<sub>80</sub>-g-HAA. EDAC activation at pH 3 for 6hr, EDAC concentration = 0.05 M; lysine immobilization at pH 10, lysine concentration = 0.05 M.

#### (G) 不同膜材與不同聚丙烯酸對離胺酸固定量之影響

以接枝聚丙烯酸的film與多孔薄膜來探討聚丙烯酸含量對固定離胺酸的影響，固定 lysine 於各薄膜之條件取得乃依據先前固定 lysine 於 M<sub>80</sub>-g-HAA 薄膜所綜合之最佳結果 (EDAC 活化條件為 pH 3 下活化 6 小時，且 EDAC 濃度為 0.05 M；固定 lysine 條件為 pH 10 下反應 24 小時，lysine 濃度為 0.05 M)，由 Table 3 可發現當薄膜表面接枝的聚丙烯酸量越高時，所固定的 lysine 量也越高，而以 M<sub>80</sub>-g-HAA 的 0.55 µg/cm<sup>2</sup> 為最高，而 Film-g-HAA 與 M<sub>80</sub>-g-LAA 的固定量相差並不大。

Table 3 Immobilization yields of lysine on poly(acrylic acid) / PHB membranes.

Code	Substrate	Lysine immobilization yield (µg/cm <sup>2</sup> )
Film-g-LAA-Lys	Film-g-LAA	0.24
Film-g-HAA-Lys	Film-g-HAA	0.34
M <sub>80</sub> -g-LAA-Lys	M <sub>80</sub> -g-LAA	0.28
M <sub>80</sub> -g-HAA-Lys	M <sub>80</sub> -g-HAA	0.55

### 5.2.3 化學分析電子光譜 (ESCA)

Figure 16 為薄膜 $M_{80}$ 與改質後之薄膜 $M_{80}$ -g-HAA與 $M_{80}$ -g-HAA-Lys之ESCA全掃描圖，由其解析出的峰值分別是C1s : 285 eV、O1s : 532eV、N1s : 400eV，由於本研究中所固定的lysine僅只  $0.55 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ，因此由全掃描圖並未能清楚做出定量分析。

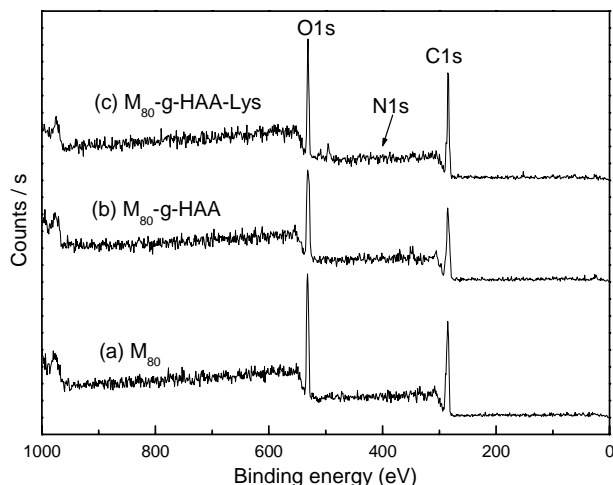


Figure 16 Wide-scan ESCA spectra of membranes  $M_{80}$ ,  $M_{80}$ -g-HAA, and  $M_{80}$ -g-HAA-Lys.

### 5.2.4 表面接觸角

未改質與幾個典型改質後PHB薄膜之對水接觸角示於Tables 4~6，當PHB薄膜為多孔結構時，因表面比較粗糙，因此其接觸角可升高到約 $115^\circ$  (Table 4)，而當薄膜表面接枝親水性聚丙烯酸時，不論film或 $M_{80}$ 其接觸角皆明顯減少，且聚丙烯酸接枝量愈高時接觸角越低，因此聚丙烯酸的接枝量與親水性的增加成正變關係，值得注意的是 $M_{80}$ 薄膜經接枝聚丙烯酸後，其表面由疏水性轉變為極親水性，水滴可直接滲透進入薄膜孔隙內，使得接觸角變為 $0^\circ$ ，而經lysine改質後之薄膜，其上表面接觸角更進一步下降，對film而言為 $32^\circ$ ，對 $M_{80}$ 而言仍為 $0^\circ$ 。

Table 4 Contact angle of water on PHB membranes

	Film	M <sub>80</sub>	M <sub>120</sub>
Top surface	80	114	115

Table 5 Contact angle of water on modified top surface of poly(acrylic acid) / PHB membranes.

Code	Film-g-LAA	Film-g-HAA	M80-g-LAA	M80-g-HAA
Top surface	77	67	0	0

Table 6 Contact angle of water on lysine immobilized membranes.

Code	Film-g-LAA-Lys	Film-g-HAA-Lys	M80-g-LAA-Lys	M80-g-HAA-Lys
Top surface	32	32	0	0

### 5.3 骨母細胞(hFOB 1.19)培養

#### 5.3.1 薄膜結構對細胞生長之影響

本研究利用不同結構的PHB薄膜進行骨母細胞(hFOB 1.19)培養，並比較其細胞活性之良窳，由Figure 17 可觀察到在培養 1 天後各薄膜的細胞生長情況只有些微的差異，而M<sub>80</sub>與M<sub>120</sub>在 1 天~3 天之間其吸收值呈增加之趨勢，且吸收值在 3 天時達到最大值，更可觀察出薄膜孔洞越大時吸收值也越大，其中又以M<sub>120</sub>的吸收值最大，而M<sub>120</sub>與Film的最大吸收值之間相差約達 1.6 倍，但骨母細胞在Film、M<sub>80</sub>、M<sub>120</sub>等三種不同薄膜上，不管任何時間之吸收值皆比控制組Tissue culture polystyrene (TCPS)低，有趣的是M<sub>120</sub>與TCPS彼此間最大吸收值卻僅相差約 15%，這是因為多孔結構之PHB有利於提供較大的表面積給予hFOB 1.19 成長，而平面之PHB卻無此優勢，因此MTT之吸收值以TCPS > M<sub>120</sub> > M<sub>80</sub> > Film之趨勢呈現。

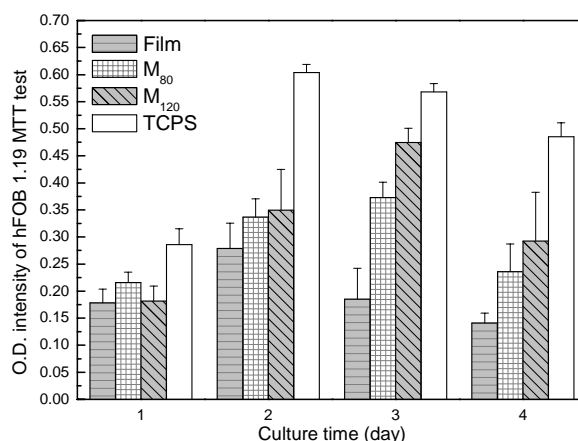


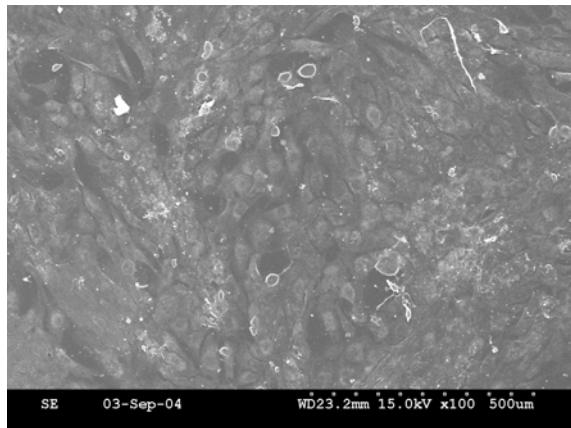
Figure 17 Effect of morphology on the viability of hFOB 1.1.9 cell grown and proliferated on PHB and control TCPS.

Figures 18 與 19 分別為hFOB 1.19 在培養盤成長的光學顯微影像與電子顯微攝影圖片，明顯可見hFOB 1.19 的成長狀況良好，一天幾乎填滿培養盤，形態為細長之多邊形。Figures 20~22 為PHB薄膜經hFOB 1.19 培養 1~4 天之電子顯微攝影影像，可發現細胞貼附情況與各組之MTT 趨勢相符，當O.D.值越高時細胞貼附量越高，O.D.值越低時細胞貼附量則越低，且細胞之尺寸隨薄膜孔隙之增大而縮小，例如培養 1 天後可由film的 200~300 $\mu$ m縮減到M<sub>80</sub>的為 50~100 $\mu$ m，此外可由Figure 22 (b-1)觀察到細胞之偽足(pseudopodia)深入薄膜孔洞內之情形，由此可知hFOB 1.19 會隨薄膜表面結構而改變尺寸與形態，這可能是造成其O.D.值大幅提升之原因。

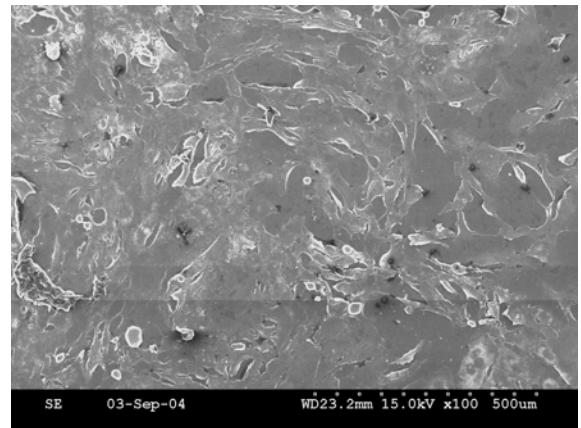


Figure 18 Optical microscopy photograph of the morphology of hFOB 1.19 cells cultured on culture plate for one day.

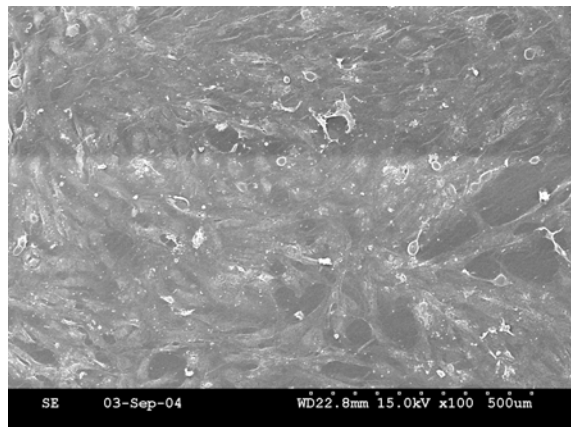
(a)



(b)



(c)



(d)

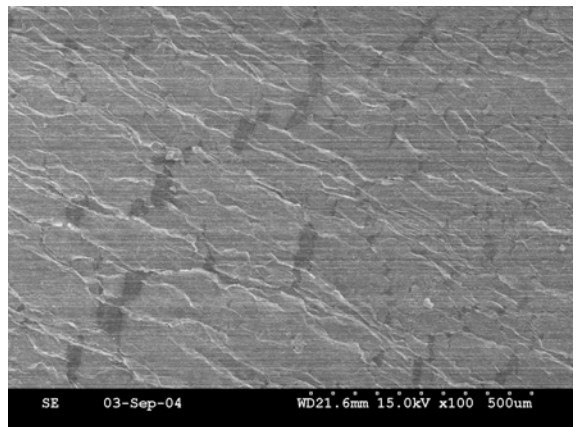
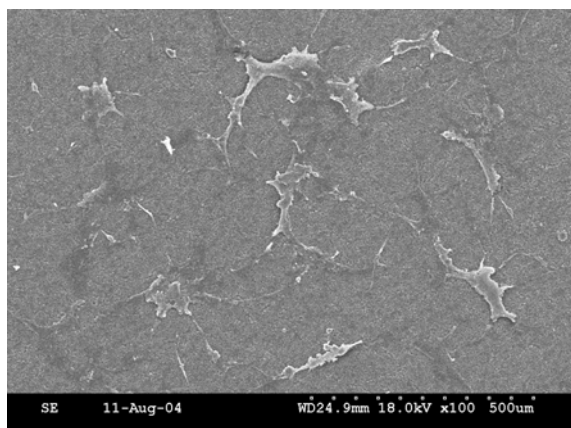
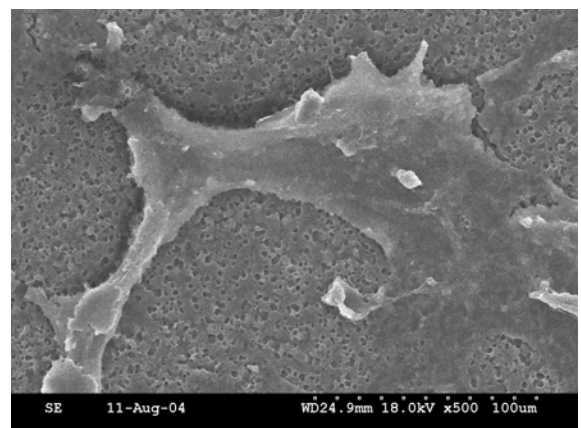


Figure 19 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on TCPS. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

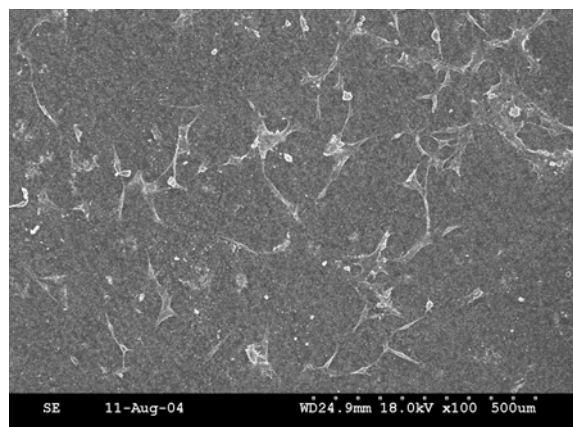
(a-1)



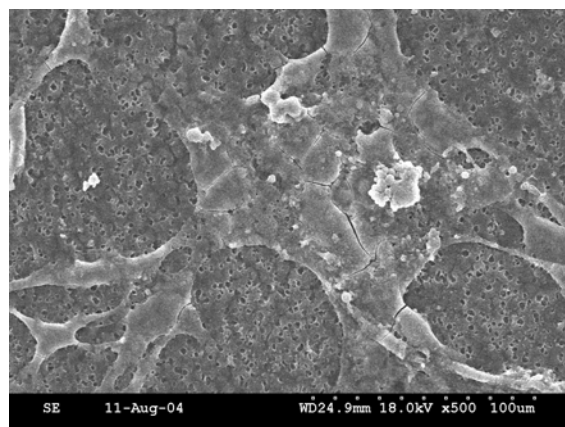
(a-2)



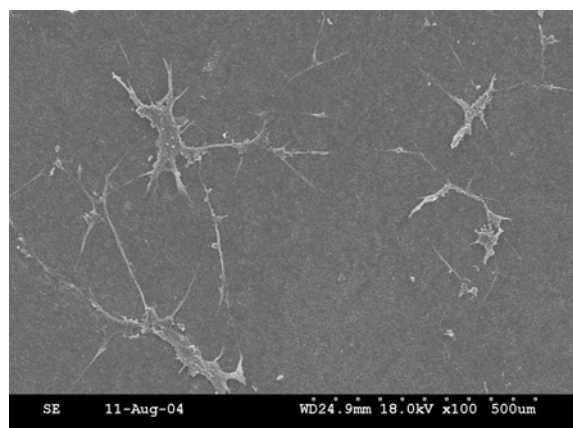
(b-1)



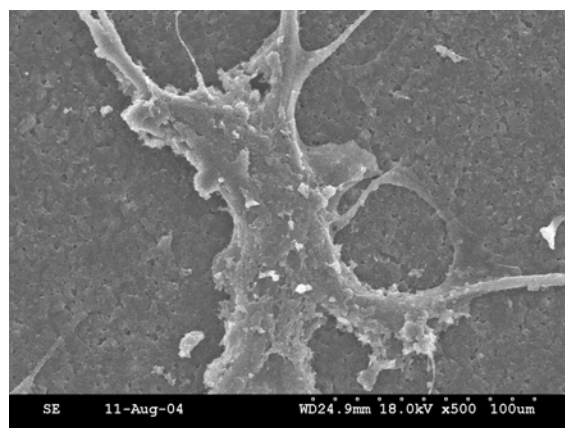
(b-2)



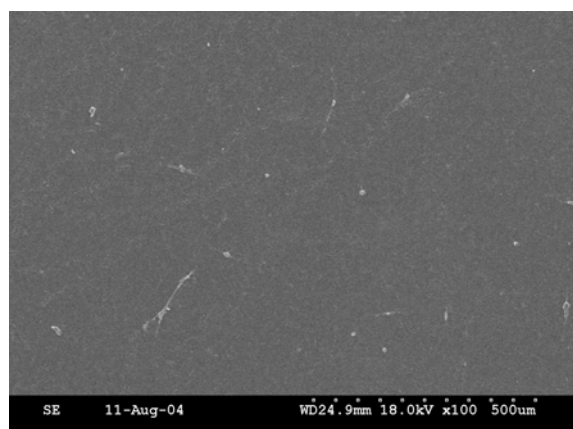
(c-1)



(c-2)



(d-1)



(d-2)

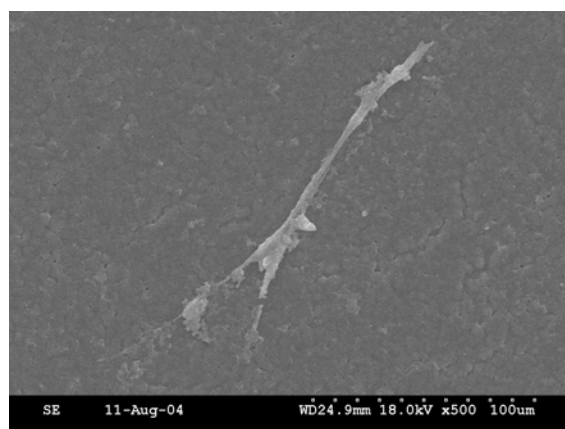
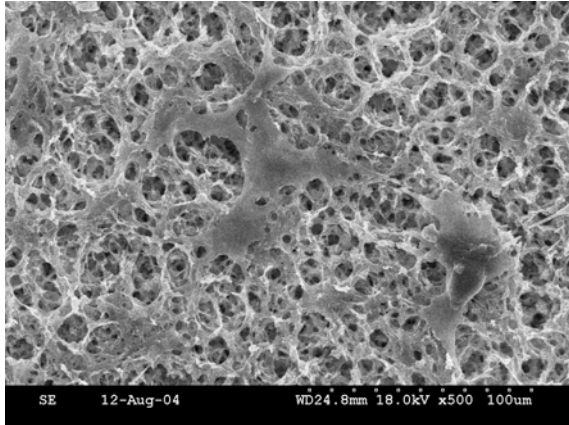
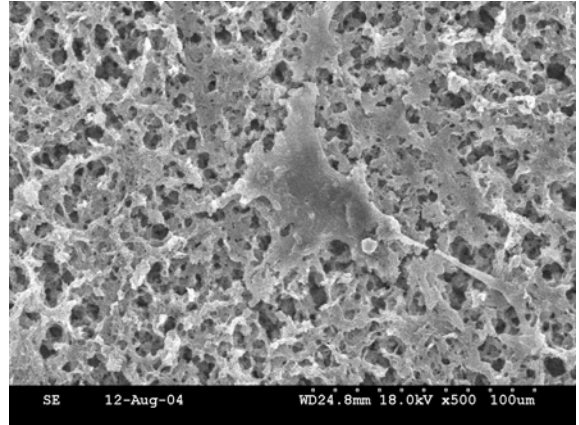


Figure 20 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on PHB film. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

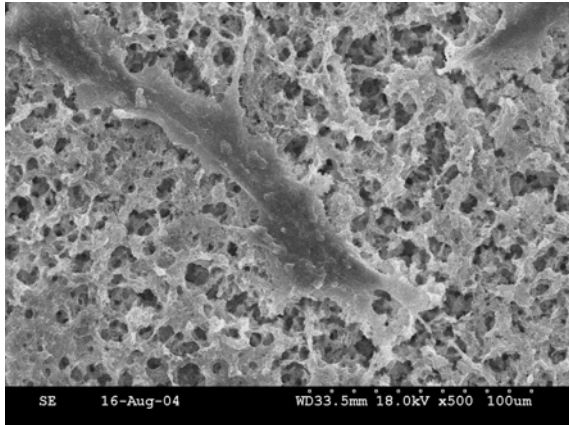
(a)



(b)



(c)



(d)

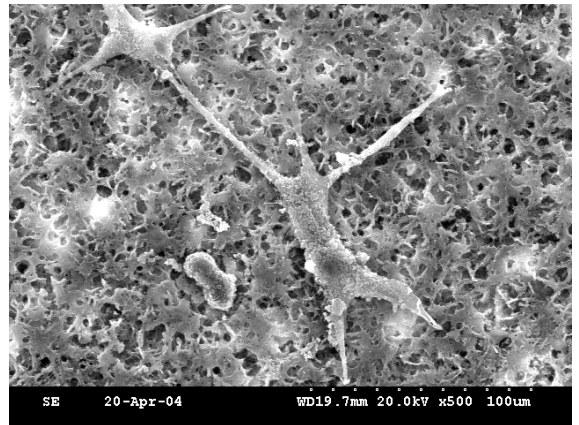
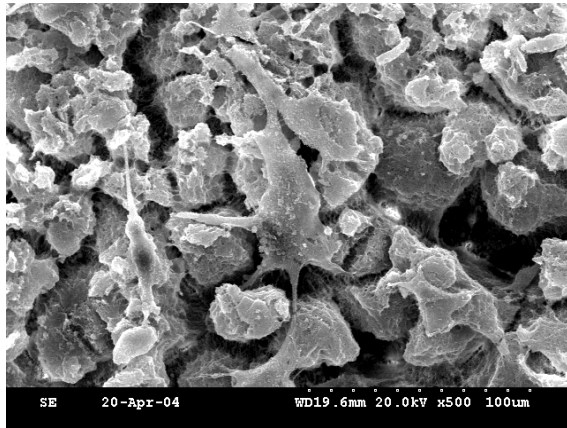


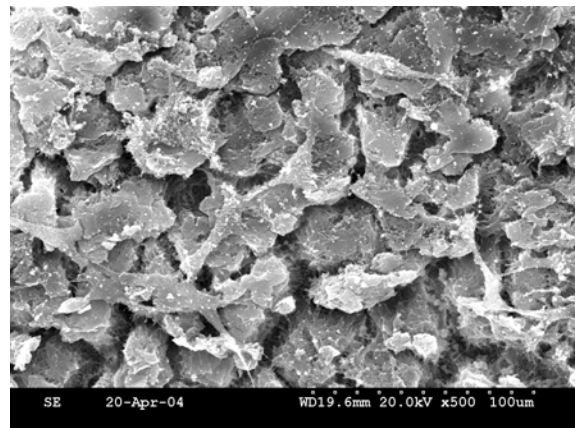
Figure 21 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on PHB membranes. Code = M<sub>80</sub>. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.



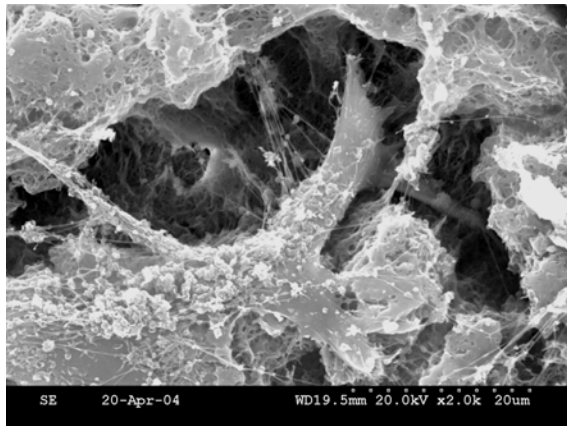
(a)



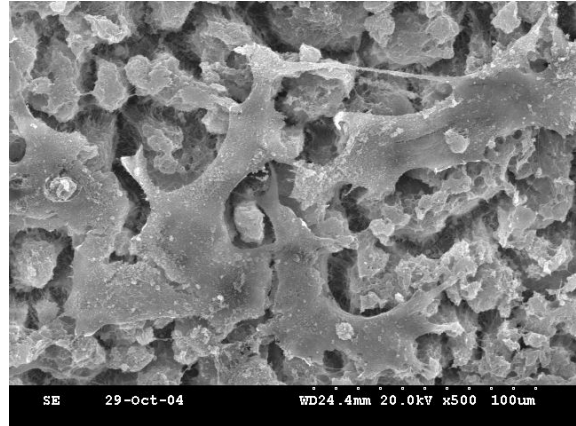
(b-1)



(b-2)



(c)



(d)

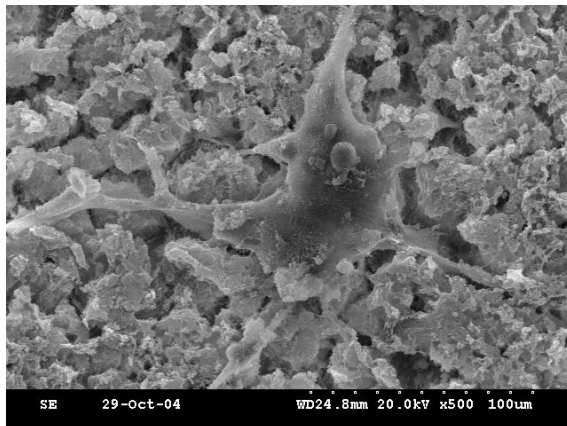


Figure 22 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on membrane  $M_{120}$ . (a) 1 day; (b) 2 day; (b-1) 2 day, 2kx; (c) 3 day; (d) 4 day.



### 5.3.2 改質薄膜對細胞生長之影響

本研究以不同結構之薄膜進行電漿接枝聚丙烯酸，再將其固定lysine，然後探討不同化學組成之表面對細胞培養的影響。由Figures 23 與 24 中MTT吸收值之趨勢可發現PHB薄膜接枝聚丙烯酸不利於hFOB 1.19 細胞生長，MTT吸收值隨細胞培養的天數增加而呈下降之趨勢，而且當聚丙烯酸含量較多時所呈現之下降趨勢更明顯，此趨勢是因為PHB薄膜表面上聚丙烯酸之羧酸基造成薄膜表面呈負電荷狀態所致【47】，但將PHB薄膜利用聚丙烯酸固定lysine，即可發現MTT吸收值有上升之趨勢，而此趨勢在Film基材上時並不明顯，這是因其lysine固定量偏低之故，而於M<sub>80</sub>薄膜上雖然有較大的lysine固定量，但也有較多的聚丙烯酸被接枝於PHB薄膜表面上，因此薄膜表面仍呈負電荷狀態，造成MTT吸收值並無法有效大幅提升，但仍可從結果之趨勢發現固定後之lysine是有益於細胞之貼附與生長。

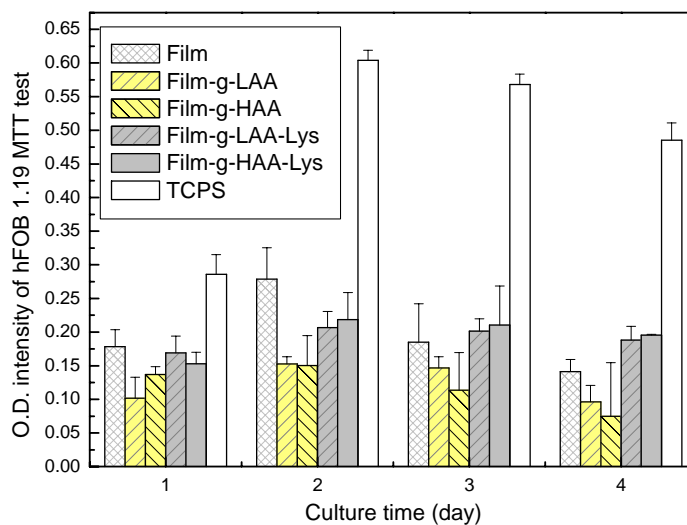


Figure 23 Effect of treatment on the viability of hFOB 1.1.9 cell growth and proliferation on PHB film and control TCPS.

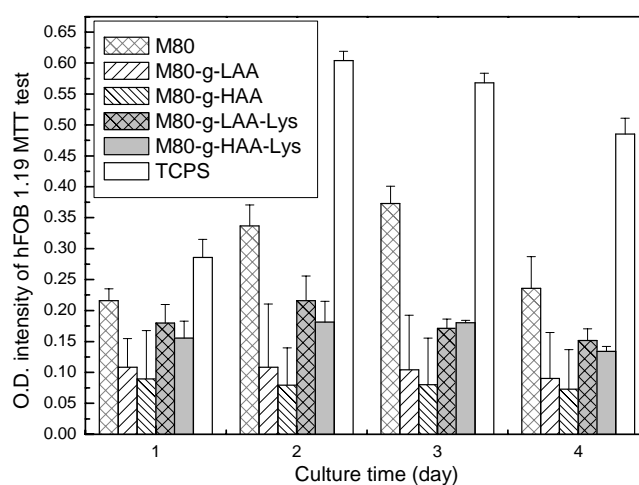
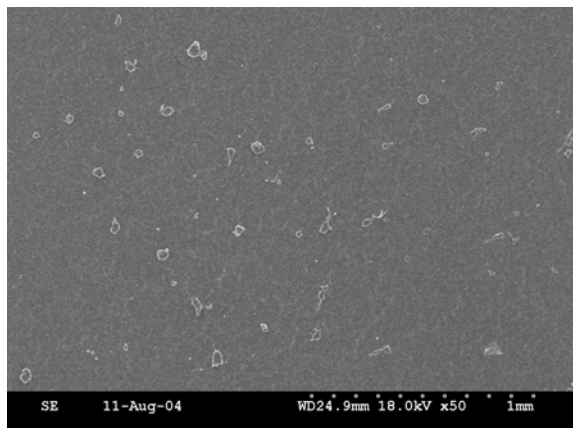


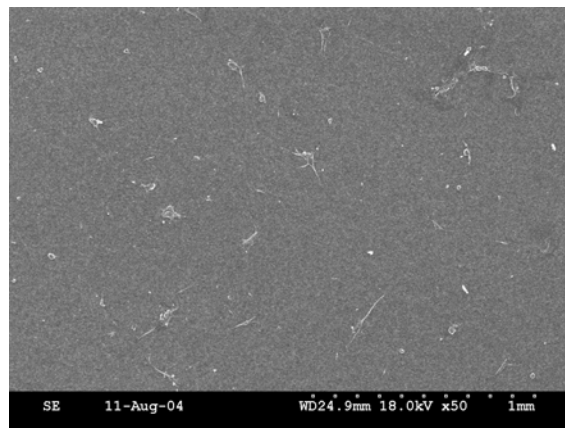
Figure 24 Effect of treatment on the viability of hFOB 1.1.9 cell growth and proliferation on membrane M<sub>80</sub> and control TCPS.

Figures 25~32 為細胞在改質之 PHB 薄膜上培養不同時間之顯微攝影圖，經丙烯酸改質之 PHB 薄膜(Figures 25~28)其細胞貼附量明顯變少，且細胞尺寸及偽足形態都明顯的萎縮，當聚丙烯酸的接枝量越大時其萎縮現象更加明顯，因此 hFOB 1.1.9 不適合在具有羧酸基的環境下培養，對於固定 lysine 之薄膜(Figures 29~32)，其細胞形態及貼附數量皆有改善之現象，惟改善程度有限，推測所固定的 lysine 量不足所致，但本研究仍可發現利用固定 lysine 的方式，具有提升細胞之活性之能力並可大幅降低使用高單價的 poly(lysine)塗佈的浪費。

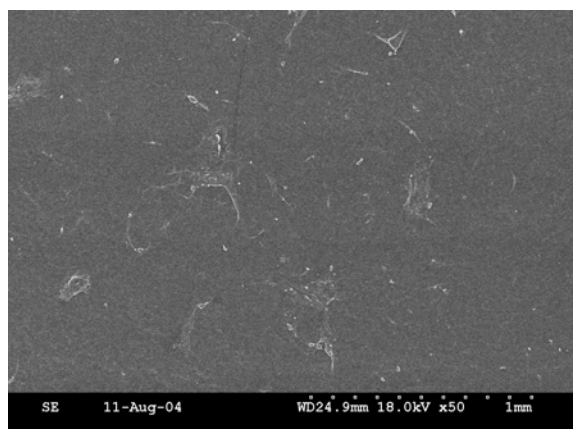
(a)



(b)



(c)



(d)

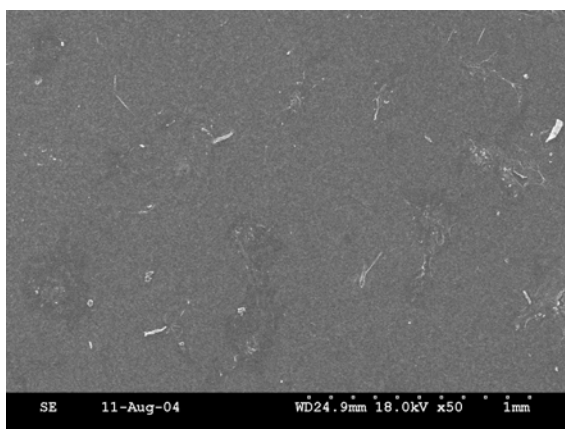
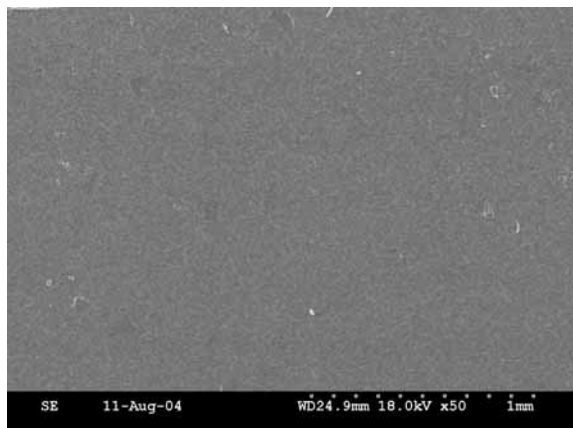
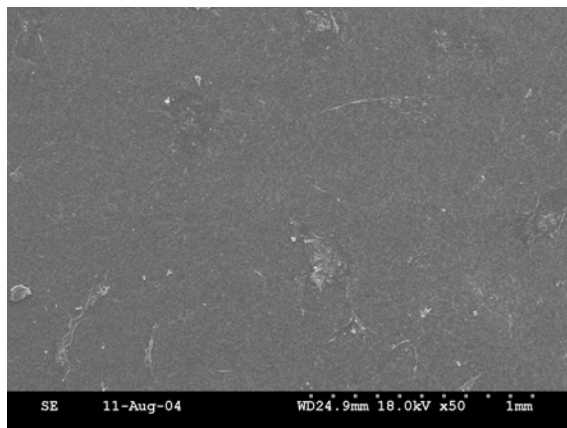


Figure 25 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on Film-g-LAA. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

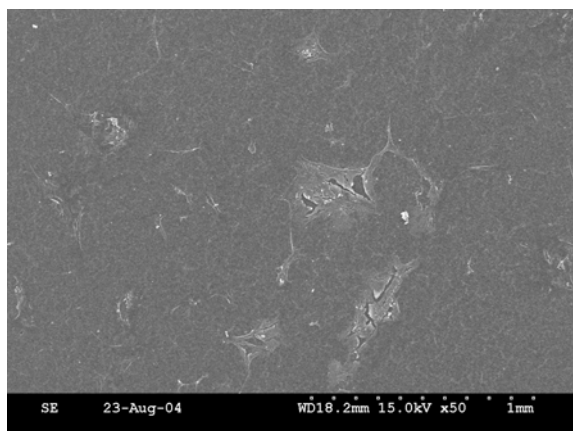
(a)



(b)



(c)



(d)

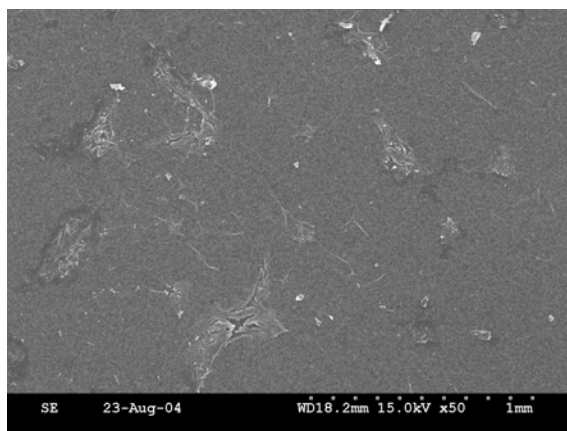
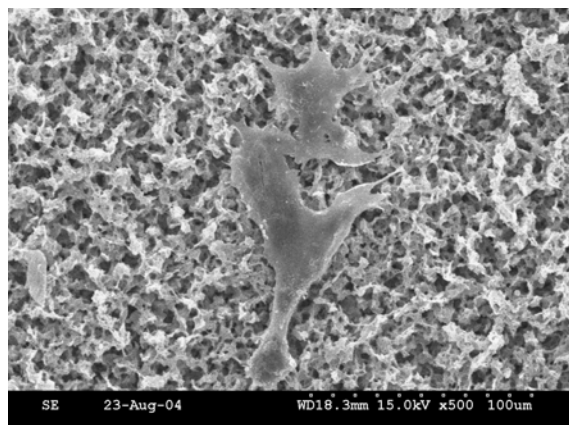
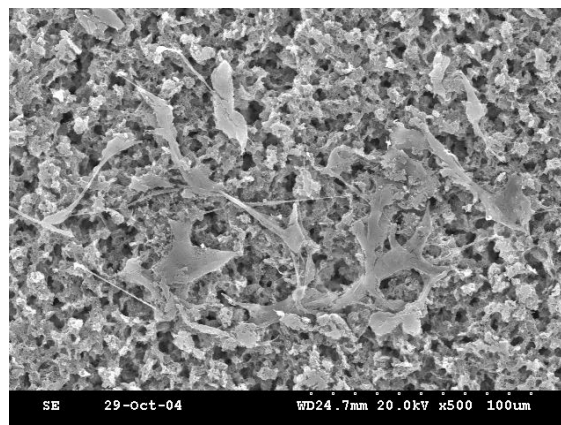


Figure 26 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on Film-g-HAA. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

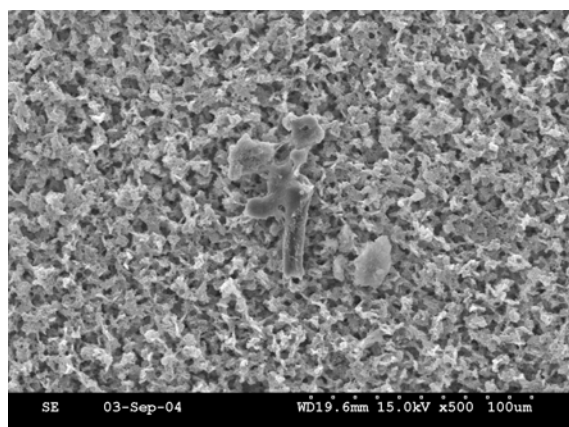
(a)



(b)



(c)



(d)

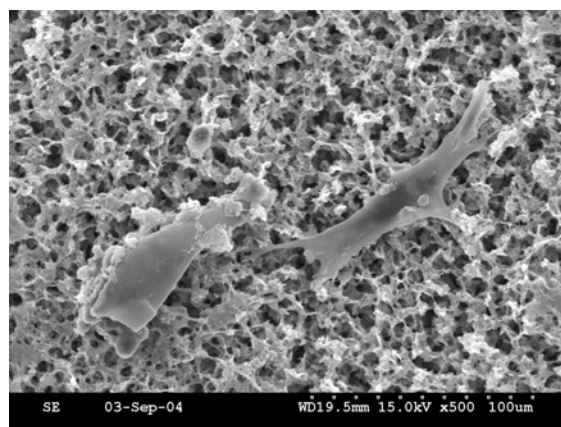
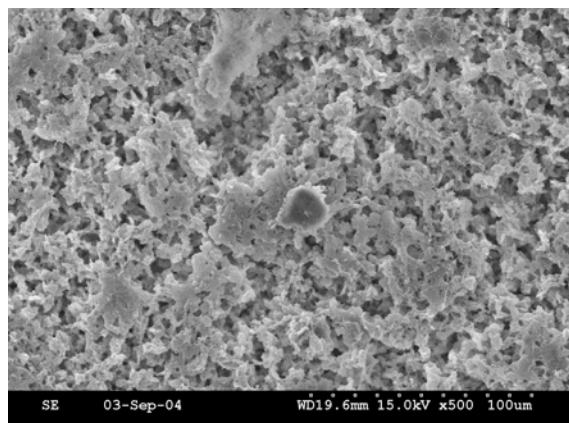
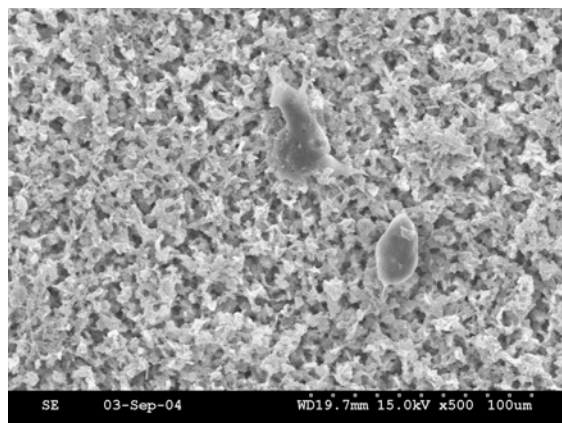


Figure 27 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on M<sub>80</sub>-g-LAA. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

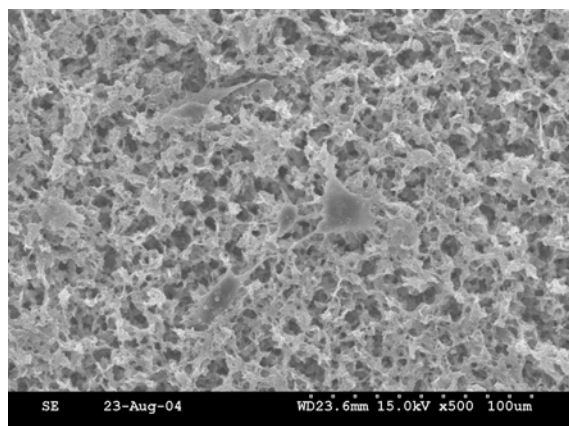
(a)



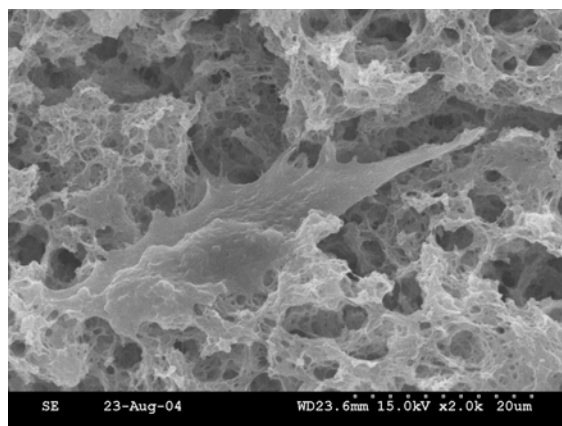
(b)



(c-1)



(c-2)



(d)

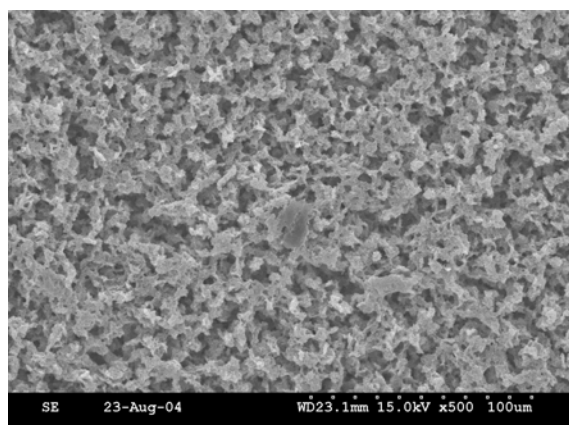
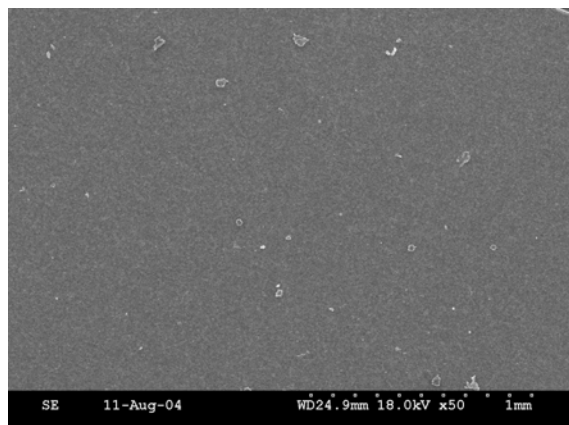
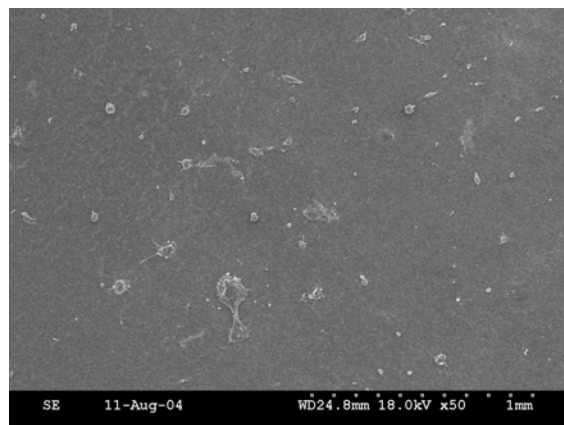


Figure 28 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on M<sub>80</sub>-g-HAA. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

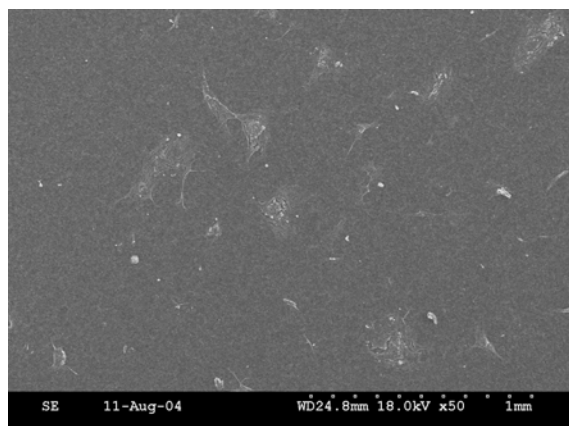
(a)



(b)



(c)



(d)

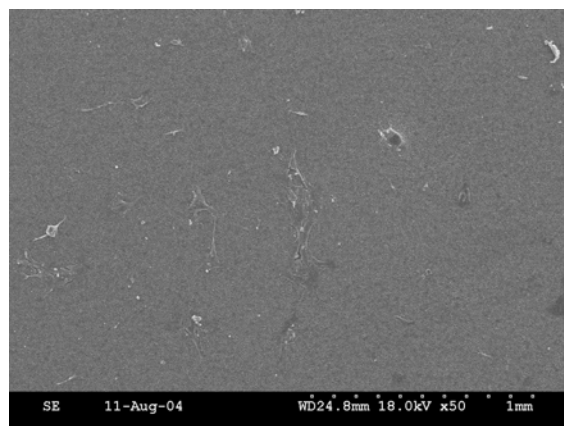
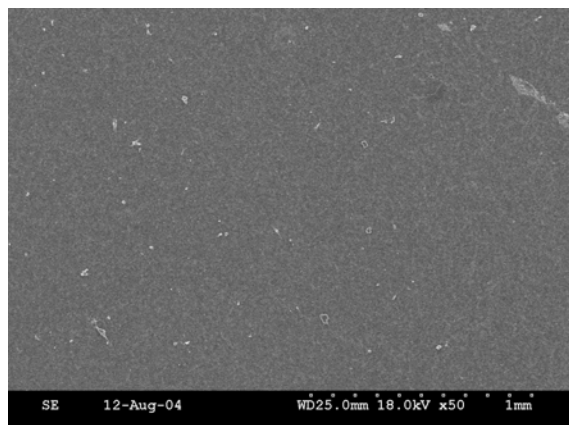
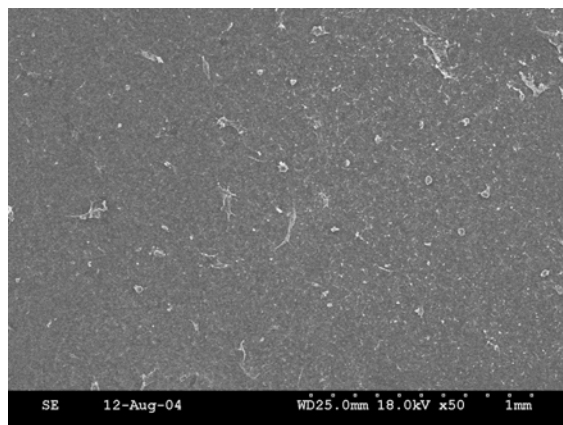


Figure 29 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on Film-g-LAA-Lys. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

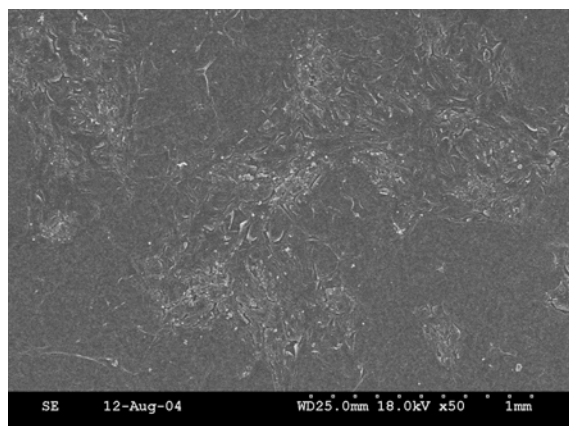
(a)



(b)



(c)



(d)

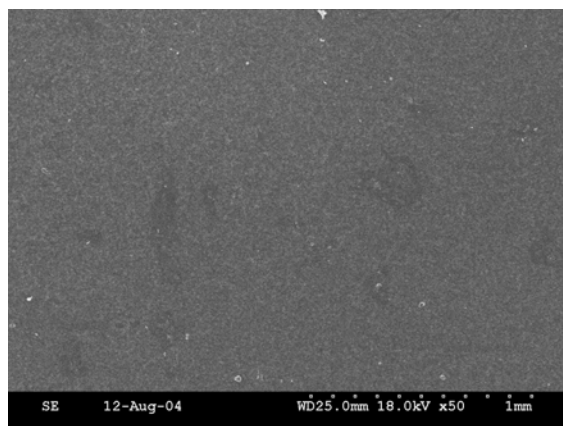
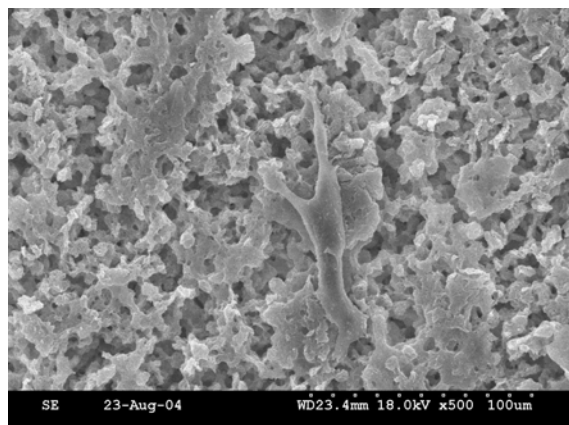


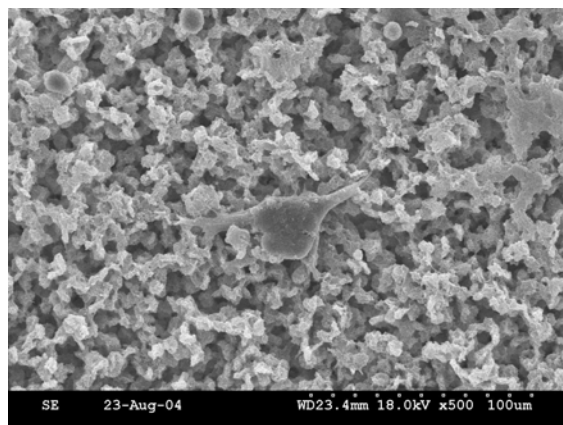
Figure 30 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on Film-g-HAA-Lys. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.



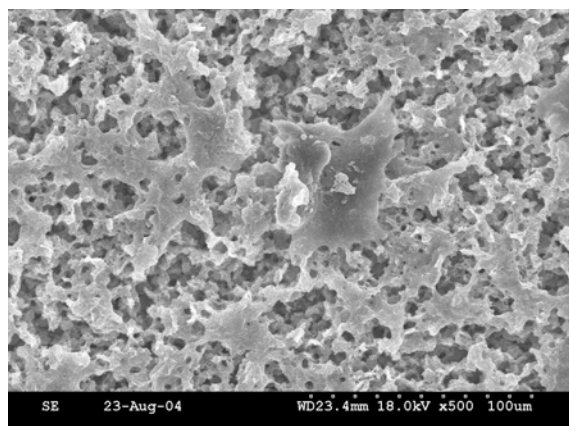
(a)



(b)



(c)



(d)

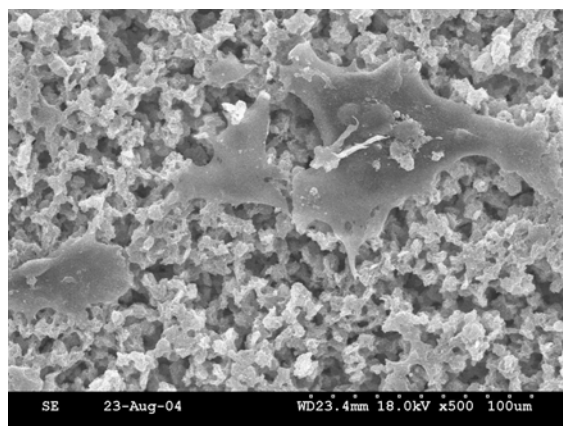
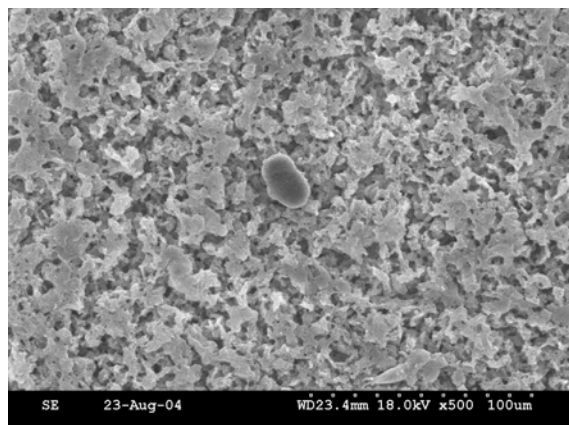
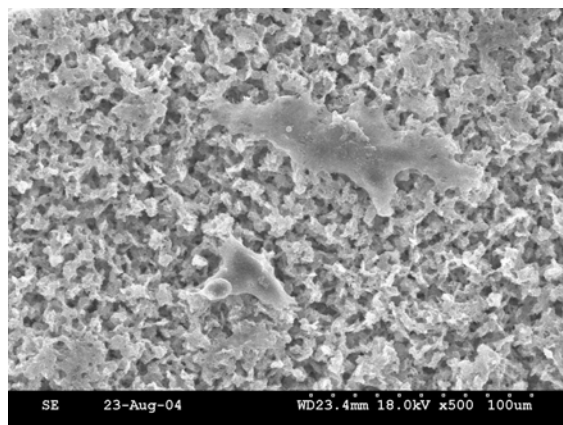


Figure 31 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on M<sub>80</sub>-g-LAA-Lys. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

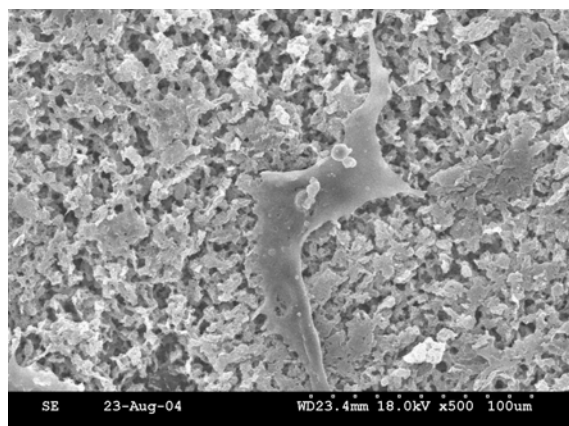
(a)



(b)



(c)



(d)

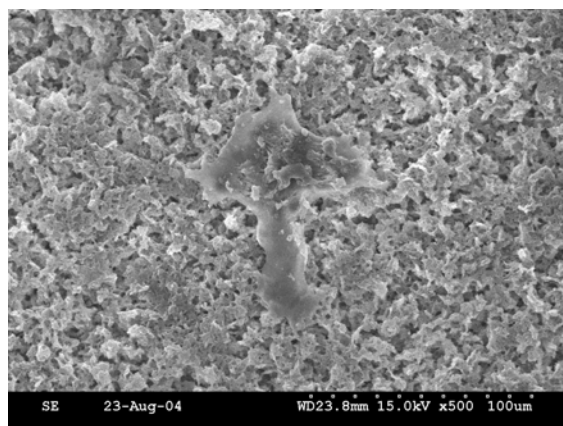


Figure 32 SEM photomicrographs of the morphologies of hFOB 1.19 cells cultured on M<sub>80</sub>-g-HAA-Lys. (a) 1 day; (b) 2 day; (c) 3 day; (d) 4 day.

## 6. 結論

1. 本研究將聚丙烯酸接枝於不同結構之PHB薄膜表面，藉由改變接枝反應時間，可獲得不同接枝量之薄膜，發現隨著反應時間增長或膜才孔隙尺寸變大接枝量亦增高，最大接枝量為  $0.47 \text{ mg/cm}^2$  為最大。
2. 本研究將lysine固定於已接枝聚丙烯酸之PHB薄膜上，並探討各變因對固定量之影響，發現當聚丙烯酸接枝量為  $0.47 \text{ mg/cm}^2$  時，最佳固定條件為：在pH 3 下以濃度 0.05M EDAC活化聚丙烯酸 / PHB薄膜 6 hr，然後在pH 10 下以濃度 0.05 M之lysine溶液反應 24 hr。而lysine固定量隨聚丙烯酸接枝量提高而增加，本研究之最大固定量為  $0.55 \text{ }\mu\text{g/cm}^2$ 。
3. 本研究利用聚丙烯酸改質PHB薄膜表面，可使原疏水性薄膜經由接枝不同量聚丙烯酸而有不同程度的親水性，對於多孔薄膜而言，水滴甚至可以直接滲透入薄膜孔洞內而使接觸角呈現  $0^\circ$ 。
4. 本研究利用骨母細胞(hFOB 1.19)進行生物相容性測試，發現經由改變薄膜孔隙大小可使得生物相容性提升，而以大孔隙者有較佳相容性；而薄膜表面經由聚丙烯酸改質會造成細胞不易存活之現象，使得細胞形態及 O.D.值皆呈萎縮或衰減現象；經固定 lysine 後之薄膜，可發現其 O.D.值有提升之趨勢，並且由電子顯微攝影圖中亦可發現細胞形態有改善之現象，但由於本研究所固定之 lysine 量不足，因此所能改善的程度有限。

## 7. 參考文獻

1. K. Studesh, H. Abe and Y. Doi, *prog. Polymer. Sci.* 25, (2000).
2. M. Jenzsch, N. Volk, J. Kressler and C. Scholz, *Biomacromolecules*, **2**, 1055 (2001).
3. J. N. Hay and L. Sharma, *Polymer*, **41**, 5749 (2000).
4. G. Hillmanna, A. Steinkamp-Zuchta, W. Geurtsena, G. Grossb and A. Ho.mannb, *Biomaterials*, **23**, 1461 (2003).
5. M. Canetti, M. Urso and P. Sadocco, *Polymer*, **40**, 2587 (1999).
6. M. Mulder, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1991).

7. R. E. Kesting, “*Synthetic Polymeric Membranes*,” John Wiley & Sons, New York, (1985).
8. L. R. Douglas, K. S. Sung and K. E. Kevin, *Journal of Membrane Science*, **64**, 1 (1991).
9. F. J. Tsai and J. M. Torkelson, *Macromolecules*, **23**, 775 (1990).
10. L. Zeman and T. Fraser, *Journal of Membrane Science*, **84**, 93 (1993).
11. L. Zeman and T. Fraser, *Journal of Membrane Science*, **87**, 267 (1994).
12. L. P. Cheng, A. W. Dwan and C. C. Gryte, *J. Polym. Sci., Part B: Polym. Phys.*, **33**, 211 (1995).
13. L. P. Cheng, A. W. Dwan and C. C. Gryte, *J. Polym. Sci.; Part B: Polym. Phys.*, **33**, 223 (1995).
14. 高正雄, “*超 LSI 時代- 電漿化學*”, 復漢出版社, 台南, (1997).
15. P. Wang, K. L. Tan, E. T. Kang and K. G. Neoh, *Journal of Membrane Science*, **195**, 1 (2002).
16. S. Laishun, *European Polymer Journal*, **36**, 12 (2000).
17. C. P. Ho and H. Yasuda, *J. Appl. Polym. Sci.*, **39**, 1541 (1990).
18. S. D. Lee, G. H. Hsiue, C. P. Chuen-Thuen and C. Y. Kao, *Biomaterials*, **17**, 16 (1996).
19. K. Fujimoto, H. Tadokoro, Y. Ueda and Y. Ikada, *Biomaterials*, **46**, 442 (1993).
20. J. Chen, Y. C. Nho, and J. S. Park, *Radiat Phys Chem.*, **52**, 201 (1998).
21. I. K. Kang, O. H. Kwon, M. K. Kim, Y. M. LEE and Y. K. Asung, *Biomaterials.*, **17**, 841 (1996).
22. I. K. Kang, O. H. Kwon, M. K. Kim, Y. M. LEE and Y. K. Sung, *Biomaterials.*, **18**, 1099 (1997).
23. S. Sano, K. Kato, H. B. Lee and J. H. Lee, *Biomaterials*, **14**, 797 (1993).
24. K. L. Carraway, and D. E. Koshloand, *Methods in Enzymol.*, **25**, 616 (1972).
25. D. R. Lloyd, and C. M. Burns, *J. Polym. Sci. Chem Ed.*, **17**, 3459 (1979).

26. D. R. Lloyd, and C. M. Burns, *J. Polym. Sci. Chem Ed.*, **17**, 3473 (1979).
27. R. Bellamkonda, J. P. Ranieri, N. Bouche, and P. Aebischer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 663 (1995).
28. S. Woerly and D. J. Morassutti, *Rev.*, **16**, 93 (1993).
29. P. Aebischer, R. F. Valentini, P. Dario, C. Domenici and P. M. Galletti, *Brain Research*, **436**, 165 (1987).
30. V. Guenard, R. F. Valentini and P. Aebischer, *Biomaterials*, **12**, (1991).
31. F. Langone, S. Lora, F. M. Veronese, P. Caliceti, P. P. Parnigotto, F. Valenti and G. Palma, *Biomaterials*, **16**, 347 (1995).
32. P. Menei, V. Daniel, C. Montero-Menei, M. Brouillard and J. P. Benoit, *Biomaterials*, **14**, 470 (1993).
33. M. S. Shoichet, S. R. Winn, S. Athavale, J. M. Harris and F. T. Gentile, *Biotechnology and Bioengineering*, **43**, 563 (1994).
34. S. T. Carbonetto and M. M. Gruver, *Scienc.*, **216**, 897 (1982).
35. R. Vellamkonda, J. P. Raneri, N. Bouche and P. Arbischer, *J. Biomed. Mater. Res.*, **29**, 663 (1995).
36. P. Aebischer, R. F. Valentini, P. Dario, C. Domenici and P. M. Galletti, *Brain Res.*, **436**, 165 (1987).
37. W. F. A. Dunnen, B. V. D. Lei, J. M. Schakenraad, I. Stokroos, A. J. Pennings and P. H. Robinson, *Microsurg.*, **14**, 508 (1993).
38. M. Borkenhagen, R. C. Stoll, P. Neuenschwander, U. W. Suter and P. Aebischer., *Biomaterials.*, **19**, 2155 (1998).
39. S. Woerly and R. Marchand, *Biomaterials*, **11**, 97 (1990).
40. A. Harsch, J. Calderon, R. B. Timmons and G. W. Gross, *J. Neurosci. Meth*, **98**, 135 (2000).

41. J. A. Neff, P. A. Tresco and K. D. Caldwell, *Biomaterials*, **20**, 2377 (1999).
42. D. Beyer, M. Matsuzawa, A. Nakao and W. Knoll, *Langmuir*, **14**, 3030 (1998).
43. Y. Iwasaki, S. I. Sawada, N. Nakabayashi, G. Khang, H. B. Lee and K. Ishihara, *Biomaterials*, **20**, 2185 (1999).
44. D. Kleinfeld, K. H. Kahler and P. E. Hockberger, *J. Neurosci*, **8**, 4098 (1988).
45. Shushi Sano, Koichi Kato and Yoshito Ikada, *Biomaterials*, **14**, 11, 817 (1993).
46. 洪耀釗, 孫逸民, 莊尊仁, 王惠民, 王豐益, “有機化學”, 歐亞書局有限公司, **11**, 520 (2004).
47. Bhuvanesh Gupta, Jons G. Hilborn, Isabelle Bisson and Peter Frey, *Journal of Applied Polymer Science*, **81**, 2993 (2001).